Sz

Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, P. Ehrlich-Frankfurt a. M., F. Hofmeister-Straßburg i. Els., C. von Noorden-Wien, E. Salkowski-Berlin, N. Zuntz-Berlin

unter Mitwirkung von

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

54ster ~~Zweiundfünfzigster~~ Band.

…b.

1913.



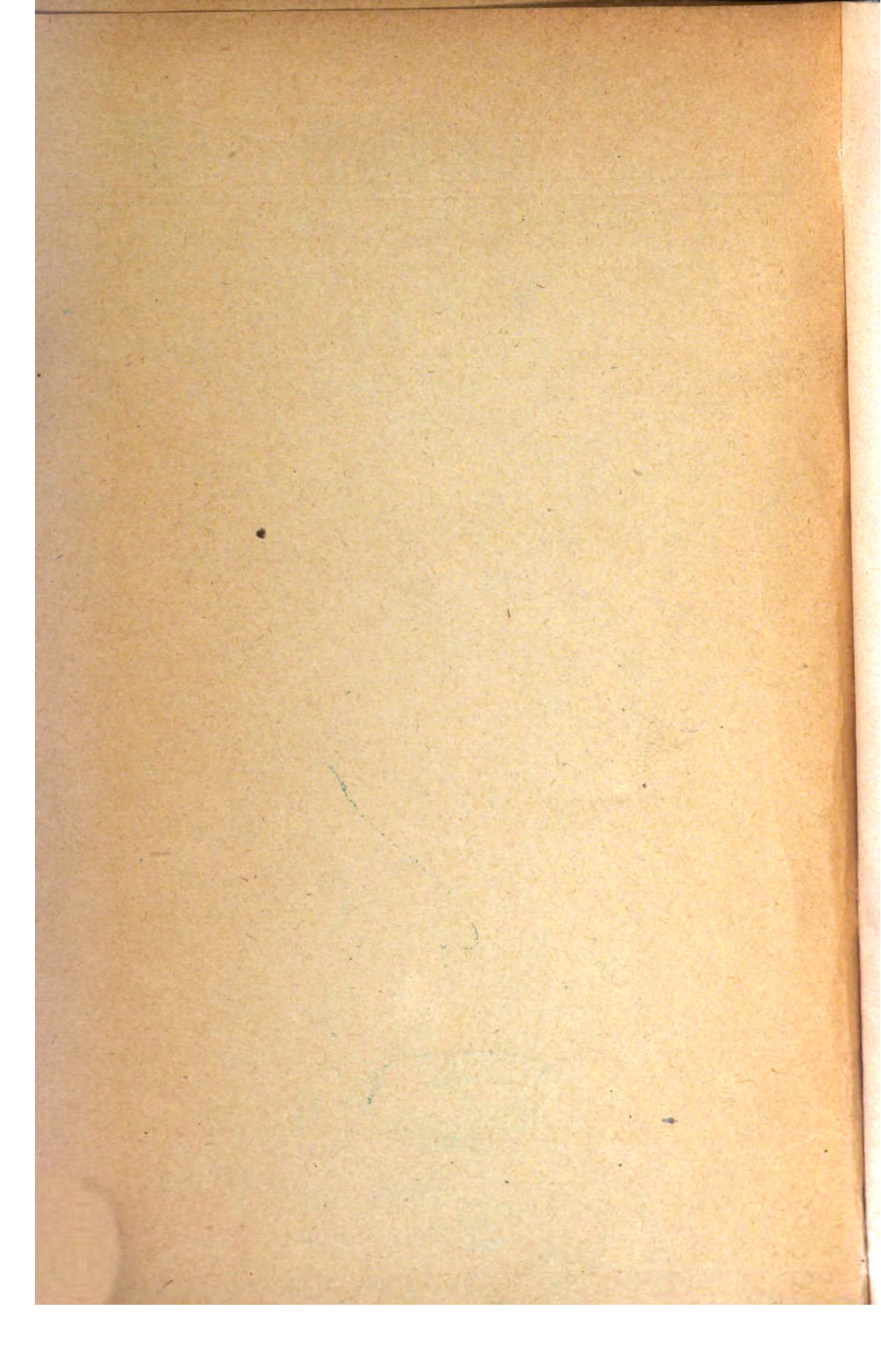


Berlin.
Verlag von Julius Springer.
1913.




E.G.KOSTER·BOEKBINDER


LEESMUSEUM
AMSTERDAM.
M



Biochemische Zeitschrift.

Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie.

Herausgegeben von

E. Buchner-Würzburg, **P. Ehrlich**-Frankfurt a. M., **F. Hofmeister**-Straßburg i. Els., **C. von Noorden**-Wien, **E. Salkowski**-Berlin, **N. Zuntz**-Berlin

unter Mitwirkung von

M. Ascoli-Catania, **L. Asher**-Bern, **J. Bang**-Lund, **G. Bertrand**-Paris, **A. Bickel**-Berlin, **F. Blumenthal**-Berlin, **A. Bonanni**-Rom, **F. Bottazzi**-Neapel, **G. Bredig**-Karlsruhe i. B., **A. Durig**-Wien, **F. Ehrlich**-Breslau, **G. Embden**-Frankfurt a. Main, **H. v. Euler**-Stockholm, **S. Flexner**-New York, **S. Fränkel**-Wien, **E. Freund**-Wien, **U. Friedemann**-Berlin, **E. Friedmann**-Berlin, **O. v. Fürth**-Wien, **G. Galeotti**-Neapel, **H. J. Hamburger**-Groningen, **A. Heffter**-Berlin, **V. Henri**-Paris, **W. Heubner**-Göttingen, **R. Höber**-Kiel, **M. Jacoby**-Berlin, **R. Kobert**-Rostock, **M. Kumagawa**-Tokio, **F. Landolf**-Buenos Aires, **L. Langstein**-Berlin, **P. A. Levene**-New York, **L. v. Liebermann**-Budapest, **J. Loeb**-New York, **W. Loeb**-Berlin, **A. Loewy**-Berlin, **A. Magnus-Levy**-Berlin, **J. A. Mandel**-New York, **L. Marchlewski**-Krakau, **P. Mayer**-Karlsbad, **J. Meisenheimer**-Berlin, **L. Michaelis**-Berlin, **J. Morgenroth**-Berlin, **W. Nernst**-Berlin, **W. Ostwald**-Leipzig, **W. Palladin**-St. Petersburg, **W. Pauli**-Wien, **R. Pfeiffer**-Breslau, **E. P. Pick**-Wien, **J. Pohl**-Breslau, **Ch. Porcher**-Lyon, **F. Roehmann**-Breslau, **P. Rona**-Berlin, **S. Salaskin**-St. Petersburg, **N. Sieber**-St. Petersburg, **M. Siegfried**-Leipzig, **S. P. L. Sörensen**-Kopenhagen, **K. Spiro**-Straßburg, **E. H. Starling**-London, **J. Stoklasa**-Prag, **W. Straub**-Freiburg i. B., **A. Stutzer**-Königsberg i. Pr., **F. Tangl**-Budapest, **H. v. Tappeiner**-München, **H. Thoms**-Berlin, **J. Traube**-Charlottenburg, **A. J. J. Vandevelde**-Gent, **W. Wiechowski**-Prag, **A. Wohl**-Danzig, **J. Wohlgemuth**-Berlin.

Redigiert von

C. Neuberg-Berlin.

Vierundfünfzigster Band.



Berlin.

Verlag von Julius Springer.

1913.



Druck von Oscar Brandstetter in Leipzig.

Inhaltsverzeichnis.

Über einige Phosphatide aus der menschlichen Placenta.

III. Mitteilung.

Von

C. Sakaki.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Kiushu.)

(Eingegangen am 17. Juni 1913.)

In meiner zweiten Mitteilung über die Placentarchemie bemerkte ich, daß „die weitere Untersuchung noch im Gange sei". Letztere ist mir leider mißlungen. Ich hatte in dieser Arbeit mitgeteilt, daß ich im warmen alkoholischen Extrakt der Placenta ein Jecorin, ähnlich dem Manasseschen „Nebennierenkörper"[1]), aufgefunden habe. Seinerzeit machte ich ferner auf folgendes aufmerksam: „Bei der von mir untersuchten Substanz war bemerkenswert, daß in einem gereinigten Teil der Muttersubstanz der Schwefel vierfach vermehrt war und die Quantität des Natriums um $^4/_5$ abgenommen hatte. Ob diese Erscheinung darauf zurückzuführen ist, daß das Jecorin, wie Bang meint, kein Natriumsalz darstellt, oder darauf, daß, wie Bing und P. Mayer behaupten, in der Muttersubstanz Lecithin vorhanden ist, das Natrium enthält, läßt sich nicht feststellen." Um diese Frage zu entscheiden, habe ich damals von der bei Anwendung der Drechselschen Jecorin-Reinigungsmethode gewonnenen Äther-Alkohol-Mutterlauge das Lecithin darzustellen versucht; der Versuch mißlang aber. Ich fügte ihr einen großen Überschuß von einer kalt gesättigten alkoholischen $CdCl_2$-Lösung hinzu, es entsteht dann ein Niederschlag. Diesen wusch ich gründ-

[1]) Diese Zeitschr. **49**, 329.

lich mit absolutem Alkohol, dann behandelte ich ihn mit Äther. Hierbei teilte sich die Substanz in einen in Äther löslichen und einen in diesem nicht löslichen Teil. Die in Äther nicht lösliche Substanz wusch ich gründlich mit Äther, nachher mit Benzol.

Eigenschaften und Zusammensetzung der in Äther nicht löslichen Substanz.

1. Die Substanz ist eine bräunlich gelbe, leicht pulverisierbare Masse.

2. Sie löst sich nicht in Äther, Benzol und Alkohol, aber in siedendem Alkohol in geringem Maße.

3. Das Vorhandensein von Stickstoff wurde mit Natronkalk, von Phosphor mit Ammoniummolybdat nach vorhergehendem Schmelzen mit Salpetermischung nachgewiesen. Schwefel und Natrium wurden in der Substanz nicht nachgewiesen.

4. Akrolein konnte nach Erhitzen mit Kaliumbisulfat durch den Geruch identifiziert werden.

Quantitative Analyse.

Die Analyse ergab folgendes Resultat:

0,3542 g liefert 0,5792 g CO_2 und 0,2352 g H_2O = 44,5 % C und 7,428 % H
0,3802 g „ 0,6230 g „ „ 0,2519 g H_2O = 44,69 % C und 7,412 % H
0,2098 g „ 0,3422 g „ „ 0,1382 g H_2O = 44,48 % C und 7,369 % H
0,2626 g „ 4,0 ccm N bei 20,8° und 765,2 mm Barometerstand 1,739 % N
0,5235 g „ 7,73 „ „ „ 18,3° „ 768,6 mm Barometerstand 1,714 % N
0,3298 g „ 4,90 „ „ „ 17,1° „ 770,0 mm Barometerstand 1,749 % N

0,7477 g	liefert	0,0940 $Mg_2P_2O_7$	=	3,244 % P
0,8486 g	„	0,1090 „	=	3,454 % P
1,0452 g	„	0,2992 $CdSO_4$	=	15,44 % Cd
1,4594 g	„	0,4240 „	=	15,67 % Cd
0,8837 g	„	0,3350 AgCl	=	9,23 % Cl
1,1433 g	„	0,4268 „	=	9,373 % Cl

Nachstehend die Durchschnittszahlen der Resultate:

Nr.	C %	H %	N %	P %	Cd %	Cl %
1	44,6	7,428				
2	44,69	7,412				
3	44,48	7,369				
4			1,739			
5			1,714			
6			1,744			
7				3,244		
8				3,454		
9					15,44	
10					15,67	
11						9,23
12						9,373
Durchschnitt	44,59	7,4029	1,732	3,344	15,555	9,3015

Ich wende mich nun dem anderen Teil der Substanz zu, die in Äther leicht löslich ist. Diesen reinigte ich mit Äther und Alkohol.

Eigenschaften und Zusammensetzung.

1. Die Substanz ist eine schwärzlich braune, leicht pulverisierbare Masse. Sie löst sich in Äther und kochendem Benzol. Beim Zusatz von absolutem Alkohol zur kalten Benzollösung entsteht ein gelblicher, flockiger Niederschlag.

2. In der Substanz sind Stickstoff und Phosphor und Natrium (Spur) nachweisbar, Schwefel dagegen nicht:

Quantitative Analyse:

Die Analyse ergab folgendes Resultat:

0,4292 g liefert 0,7182 g CO_2 und 0,2690 g H_2O = 45,63 % C und 7,011 % H

0,3750 g „ 0,6256 g „ „ 0,2334 g H_2O = 45,50 % C und 6,962 % H

0,6686 g „ 11,43 ccm N bei 22,4° und 760,8 mm Barometerstand = 1,915 % N

0,3340 g „ 5,60 „ „ „ 24,1° „ 754,5 mm Barometerstand = 1,870 % N

0,7830 g liefert 0,1000 g $Mg_2P_2O_7$ = 3,555 % P
1,0980 g „ 0,1420 g „ = 3,600 % P
0,9278 g „ 0,2522 g $CdSO_4$ = 14,66 % Cd
0,7502 g „ 0,1998 g „ = 14,34 % Cd
0,4614 g „ 0,3354 g AgCl = 11,37 % Cl
0,7296 g „ 0,2132 g „ = 11,42 % Cl

Aus obigen Zahlen erhielt ich folgende Durchschnittszahlen:

Nr.	C %	H %	N %	P %	Cd %	Cl %
1	45,63	7,011				
2	45,50	6,962				
3			1,915			
4			1,871			
5				3,555		
6				3,600		
7					14,66	
8					14,34	
9						11,37
10						11,42
Durchschnitt	45,55	6,987	1,8925	3,5775	14,51	11,395

Bekanntlich ist im Cadmiumchlorid die Proportion zwischen Cadmium und Chlor 112,4 : 71 = 1,58 : 1, in der von mir erstgewonnenen Substanz ist die Proportion 11,555 : 9,3015 = 1,67 : 1 und in der letztgewonnenen 14,51 : 11,395 = 1,27 : 1.

Hieraus erhellt, daß die letztere einen abnorm großen Gehalt an Chlor hat, dies könnte aber, wie schon erwähnt, auf einen ev. Gehalt der Substanz an Natriumchlorid zurückgeführt werden. Wenn man das Cadmiumchlorid aus gefundenem Cadmium berechnet, so bekommt man folgende Proportion:

$$N : P : CdCl_2 = 1,176 : 1 : 1,111.$$

Auf Grund eben erwähnter Tatsachen kommt man zu folgendem Schluß: Die Substanz könnte als eine Art Lecithin betrachtet werden, wenn sie auch noch unrein ist. Die erste Substanz, die in Äther und Benzol schwer löslich ist, steht vielleicht dem Lecithin nahe, und das Verhältnis zwischen Stickstoff, Phosphor und Cadmiumchlorid der Substanz ist

$$1,14 : 1,00 : 1,21.$$

Für diese beiden Substanzen lassen sich also bestimmte chemische Formeln nicht aufstellen. Wie Erlandsen, Strecker und Ulpianis angaben, verbinden sich die Lecithine mit Cadmiumchlorid nicht nach einem bestimmten Verhältnis, ebenso auch meine Substanz.

Aus äußeren Gründen habe ich meine Untersuchungen abbrechen müssen.

Über die Phosphorverteilung in der Placenta.

Von

C. Sakaki, Tokio.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 17. Juni 1913.)

Die Frage des Lipoidgehaltes der Placenta ist in neuerer Zeit Gegenstand der Aufmerksamkeit verschiedener Autoren geworden. Bianca Bienenfeld[1]) kommt nach ihren Untersuchungen zu folgenden Resultaten. Der Gehalt der Placenta an Fett und Lipoiden ist in einem frühen Stadium der Schwangerschaft doppelt so hoch, als am Ende; im ersten Schwangerschaftsmonat zeigt die Placenta einen 10mal so großen Gehalt an Cholesterinestern als im reifen Zustande, auch der Gehalt an freiem Cholesterin nimmt mit zunehmender Reife der Placenta ab. Von großem Interesse sind auch die Unterschiede zwischen normaler Placenta und solcher von eklamptischen. Bei solchen fand B. etwas mehr Lipoide und etwas mehr Cholesterinester, dagegen weniger freies Cholesterin. Der Petroleumätherauszug erwies sich etwas reicher an Phosphor, als bei normaler Placenta, in der B. überhaupt nur Spuren von Lipoidphosphor fand.

Auf Vorschlag von Herrn Prof. E. Salkowski habe ich die Verteilung des Phosphors bezüglich des Gesamtphosphors und Phosphatidphosphors untersucht. Herrn Geh.-Rat Prof.

---

[1]) Diese Zeitschr. **43**, 245.

Franz, der mir die Placenten zur Verfügung gestellt hat, spreche ich meinen verbindlichsten Dank dafür aus.

Ich verfuhr folgendermaßen: Zuerst entfernt man die Eihaut und nabelt ab, dann zerhackt man die Placenta mit dem Wiegemesser und schabt den drüsigen Teil (Decidua) mit einem Löffel ab. Man bekommt so fast nur den bindegewebsfreien Teil. Den Rest zerhackt man nochmals und schabt wieder ab.

An dem gut durchgerührten Placentabrei machte ich folgende Bestimmungen:

1. Einige Gramm — genau gewogen — wurden im Wiegegläschen mit absolutem Alkohol gut durchgerührt, auf dem Wasserbad allmählich abgedampft, dann bei 105° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

2. Etwa 10 g — genau gewogen — wurden in einer Nickelschale getrocknet und mit Salpetermischung verschmolzen. Die Bestimmung der Phosphorsäure geschah nach den von Woy[1]) gegebenen Vorschriften.

3. Zur Bestimmung des Phosphatidphosphors wurden ca. 25 g — genau gewogen — mit Alkohol absolutus auf dem Wasserbad gekocht, durch Glaswolle heiß filtriert, die Glaswolle samt dem darauf Befindlichen in den Kolben zurückgebracht und wieder mit Alkohol absolutus erhitzt. Dies wurde mehrmals wiederholt: Filtrat I. Der so erhaltene Rückstand wurde im Soxhlet mit Petroleumäther extrahiert, filtriert. Filtrat II: Beide Filtrate wurden verdampft und der gebliebene Rückstand mit Petroleumäther aufgenommen, durch Glaswolle filtriert, dabei löste sich nicht alles. Den in Petroläther unlöslichen Teil löste ich in Chloroform, dies geschah deshalb, weil ich früher gefunden habe[2]), daß der Petroläther ein Phosphatid aufnimmt, das sich nachher nicht bei Zimmertemperatur in Petroläther auflöst, wohl aber in Chloroform. Die Auszüge wurden vereinigt, verdampft und mit Salpetermischung geschmolzen. Nachfolgende Tabelle enthält die gefundenen Werte:

---

[1]) Treadwell, Analytische Chemie II. 5. Auflage, S. 360.

[2]) Diese Zeitschr. 49, 317.

Tabelle I.

Nummer	Placentabrei	Trockensubstanz		Gesamtphosphor			Lipoidphosphor				Lipoidphosphor in Prozenten des Gesamtphosphors
				Placentabrei	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5 auf 100 g Trockensubstanz	Placentabrei	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5 auf 100 g Trockensubstanz	Distearyllecithin (Faktor 11,38) auf 100 g Trockensubstanz	
	g	g	%	g	g	%	g	g	%	%	
1	2,9000	0,5260	18,10	12,4800	0,0670	1,860	26,1000	0,0375	0,507	5,770	27,30
2	3,9230	0,5300	13,50	11,5040	0,0552	2,265	30,3790	0,0448	0,696	7,900	30,80
3	3,7306	0,5920	15,90	13,2556	0,0626	2,045	26,0744	0,0470	0,725	8,250	35,43
4	6,1950	1,0205	16,50	13,1830	0,0730	2,140	24,6290	0,0344	0,541	6,156	25,30
5	3,7600	0,6026	16,02	12,3640	0,0776	2,500	29,0420	0,0446	0,611	6,950	24,40
6	4,9980	0,8584	17,20	12,1610	0,0606	1,850	26,7320	0,0444	0,617	7,017	33,40
7	3,6850	0,6155	16,70	12,3330	0,0625	1,935	27,1330	0,0390	0,548	6,240	28,30
8	4,2790	0,7034	16,40	12,0675	0,0625	2,015	26,6290	0,0380	0,554	6,300	27,50
9	3,7925	0,5785	15,30	10,3080	0,0580	2,350	36,5230	0,0480	0,550	6,250	23,40
10	2,9276	0,4095	14,00	11,0690	0,0597	2,460	38,2000	0,0545	0,652	7,420	26,50
Durchschnitt .			15,96	—	—	2,142	—	—	0,6001	6,825	28,23

Es schien wünschenswert, dieselben Untersuchungen auch an der nicht vorbehandelten ganzen Placenta durchzuführen ohne Änderung des Extraktionsverfahrens. Die Werte sind in Tabelle II enthalten:

Tabelle II.

Nummer	Placentabrei	Trockensubstanz		Gesamtphosphor			Lipoidphosphor				Lipoidphosphor in Prozenten des Gesamtphosphors
				Placentabrei	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5 auf 100 g Trockensubstanz	Placentabrei	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5 auf 100 g Trockensubstanz	Distearyllecithin auf 100 g Trockensubstanz	
	g	g	%	g	g	%	g	g	%	%	
1	4,5720	0,7216	15,80	9,4671	0,0516	2,21	21,5596	0,034	0,638	7,25	34,6
2	7,1262	1,1168	15,66	11,0778	0,0530	1,95	23,0174	0,036	0,636	7,22	30,6
3	7,0936	1,1485	16,20	12,4890	0,0684	2,16	25,0890	0,035	0,542	6,06	25,1
Durchschnitt .			15,886	—	—	2,106	—	—	0,605	6,84	30,1

Wie man sieht, ist die Übereinstimmung eine außerordentlich große, fast vollständige.

Nunmehr fragt es sich, ob man durch ein anderes Extraktionsverfahren nicht vielleicht noch etwas höhere Werte erhalten könne.

Zu dem Zwecke wurden vergleichende Bestimmungen an der ganzen Placenta ausgeführt, einerseits nach dem bisher benutzten Verfahren, andererseits auf folgendem Wege:

Zuerst wurde die Placenta mit Alkohol ausgekocht, dann mit einem Gemisch von Benzol mit Alkohol, endlich mit Benzol allein, immer 3 Stunden lang. Die beim Verdampfen dieser Auszüge gebliebenen Rückstände wurden einzeln mit Benzol behandelt und der Phosphor dieser Auszüge bestimmt.

Es ergab sich konstant, daß in dem ersten alkoholischen Auszug fast aller Phosphor enthalten war, in dem zweiten alkohol-benzolischen nur noch sehr wenig, in dem dritten rein benzolischen gar nichts. Ferner aber zeigte sich, daß diese Methode der Extraktion etwas weniger Phosphor liefert wie die zuerst angewendete. Es scheint demnach, als ob die Extraktion mit Benzol nicht so vollständig ist wie die mit Chloroform, daß also das Benzol aus dem ersten Alkoholauszug nicht allen Phosphor aufgenommen hat.

Tabelle III.

Lipoidphosphor der ganzen Placenta.

Trockensubstanz	A. Alkoholextrakt, der nach dem Abdampfen mit Petroläther, dann mit Chloroform behandelt ist				B. Alkohol-, Benzolalkohol- und Benzolextrakt, der nach dem Abdampfen mit Benzol behandelt ist					
	Placentabrei	$Mg_2P_2O_7$	P_2O_5 auf 100 g Trockensubstanz	Distearyllecithin auf 100 g Trockensubstanz	Placentabrei	$Mg_2P_2O_7$ Alkohol-extrakt	$Mg_2P_2O_7$ Alkoholbenzol-extrakt	$Mg_2P_2O_7$ Benzol-extrakt	P_2O_5 auf 100 g Trockensubstanz	Distearyllecithin auf 100 g Trockensubstanz
%	g	g	%	%	g	g	g	g	%	%
15,80	21,5596	0,034	0,638	7,25	12,6002	0,015	0,0010	—	0,5125	5,825
15,66	23,0174	0,036	0,636	7,22	15,3076	0,019	0,0007	—	0,5200	5,970
16,20	25,0890	0,035	0,542	6,06	10,4730	0,012	0,0006	—	0,4740	5,380
15,89	—	—	0,6053	6,843	—	—	—	—	0,5025	5,725

Vergleichen wir nun die von uns gefundenen Werte für den Phosphatidgehalt der normalen Placenta mit den von anderen Autoren angegebenen, so ergibt sich folgendes:

Bianca Bienenfeld[1]) hat nur Spuren von Lipoidphosphor gefunden gegenüber der von mir nach Tabellen I und II festgestellten doch nicht unerheblichen Zahl von im Mittel rund

[1]) Diese Zeitschr. 43, 245.

6,8 g Lecithin auf 100 g Trockensubstanz. Ich bin der Ansicht, daß diese Differenz in der Methode begründet ist. Bienenfeld hat aus der Placenta durch Verreiben mit geglühtem wasserfreien Natriumsulfat nach S. Fränkel und Elfer ein trockenes Pulver hergestellt, das dann mit Petroleumäther extrahiert wurde. Nach den Angaben von M. Kumagawa und K. Suto[1]) ist Petroleumäther ein schlechtes Extraktionsmittel für Lipoide überhaupt. Allerdings gibt Bienenfeld an, daß Alkohol aus dem mit Petroleumäther extrahierten Material nichts mehr von Lipoiden aufnahm.

Zweckmäßiger erscheint es nun jedenfalls, die frische Placenta mit Alkohol auszukochen, der die Phosphatide, wenigstens das Lecithin und diesem nahestehende Körper, leicht löst. Allerdings habe ich dann im weiteren Verlaufe auch Petroleumäther zur Trennung von etwa gelösten phosphorsauren Salzen angewendet, aber außerdem auch Chloroform für denjenigen Teil der Phosphatide, der sich in Petroleumäther nicht löst. Ganz ausgeschlossen erscheint mir, daß der Gehalt an Phosphor etwa durch phosphorsaure Salze vorgetäuscht ist. Als Beweis dafür, daß es sich wirklich um Phosphatide handelt, dienen die in Tabelle III enthaltenen Zahlen, die unter Anwendung von Benzol erhalten wurden, in dem sich phosphorsaure Salze ganz sicher nicht lösen.

Sehr viel näher stehen den von uns gefundenen Werten für Lecithin die von L. Mohr und W. Heimann[2]) angegebenen. Sie fanden für die normale Placenta auf 100 g Trockensubstanz im Mittel 4,3835 g Distearyllecithin. Daß auch ihre Zahlen etwas hinter den von uns gefundenen zurückbleiben, ist vielleicht gleichfalls durch die Methodik verursacht. Die Autoren sagen: „Die gewonnenen Extrakte wurden durch Asbest und Glaswolle filtriert und durch Verdunstenlassen auf dem Wasserbade und im Ventilator und Wiederaufnehmen des auf 50° erwärmten Rückstandes in Äther und Filtration mehrfach gereinigt[3]) und schließlich im Meßkolben auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt. Eine bisweilen nachträglich auftretende Trübung wurde durch nochmalige Filtration beseitigt.“

[1]) Diese Zeitschr. 8, 212.
[2]) Diese Zeitschr. 46, 367.
[3]) Im Original nicht gesperrt.

Ist es nicht denkbar, daß durch diese energische Reinigung Phosphatide, die ja zum Teil gar nicht so leicht löslich in Äther sind, beseitigt sind?

Auch daß die Autoren ihrer Untersuchung ein aus der Placenta erhaltenes Trockenpulver zugrunde gelegt haben, ist vielleicht nicht ganz unbedenklich. Für die Fettbestimmung ist doch dieser Weg ziemlich allgemein aufgegeben und wird jedenfalls nur als Notbehelf benutzt.

Die von mir gefundene Zahl für den Gesamtphosphor in der Placenta im Mittel 2,142 P_2O_5 nach Tabelle I, 2,106 nach Tabelle II — für 100 g Trockensubstanz — stimmt mit der von Mohr und Heimann in einem Versuch festgestellten 2,0 sehr nahe überein.

Neues zur Theorie der Wassermannschen Reaktion.

Von

Georges Dreyer und E. W. Ainley Walker.

(Aus dem Pathologischen Institut der Universität Oxford.)

(Eingegangen am 10. Juni 1913.)

Die Wassermannsche Reaktion ist anerkanntermaßen einer der wertvollsten Beiträge jüngsten Datums zu der stetig sich vergrößernden Zahl von serodiagnostischen Methoden, die jetzt dem klinischen Pathologen zur Verfügung stehen. Sie besteht bekanntlich in der praktischen Anwendung der wichtigen Entdeckung von Bordet und Gengou, die das als Komplementbindung bezeichnete Phänomen zur Diagnose einer spezifischen Infektion benutzt.

Wenn auch die Reaktion in bezug auf ihren praktischen Wert vollauf gewürdigt wird und als diagnostisches Hilfsmittel nicht mehr gemißt werden kann, so ist doch das innerste Wesen des ihr zugrunde liegenden Mechanismus trotz tiefgehender theoretischer Diskussionen noch immer zum großen Teile unaufgeklärt.

Es ist nicht unsere Absicht, an dieser Stelle auf die schier unübersehbare Literaturfülle näher einzugehen, die sich in den letzten Jahren über diesen Gegenstand angehäuft hat. Nur einige Punkte, die für uns von besonderem Interesse sind, seien hier erörtert.

In der Wassermannschen Reaktion haben wir es mit 5 Einzelfaktoren zu tun, es sind dies nämlich: 1. das zu untersuchende Serum — normales oder syphilitisches, 2. das sogenannte Antigen, 3. die Aufschwemmung von roten Blutkörperchen, 4. der Amboceptor und 5. das Komplement. Die drei letzteren bilden das hämolytische System.

Ursprünglich glaubte man, daß zum Zustandekommen der Reaktion ein spezifisches Antigen, z. B. syphilitischer Leberextrakt, notwendig sei. Die Erfahrung hat aber später ergeben, daß dieses Antigen durch nichtsyphilitisches Material ersetzt werden kann, so durch Alkoholextrakte von Menschen- oder Kaninchenherzen. Daraus folgt, daß die Rolle des Antigens keine spezifische ist. Worin besteht nun letzten Endes seine Wirkung?

Diese Frage haben wir zum Ausgangspunkt unserer Arbeit gemacht, wobei uns in einigen Versuchen Herr J. Mc K. Mc Lean unterstützt hat, der in unserem Institut gerade mit einer Reihe von Problemen bezügl. der Hämolyse beschäftigt ist. Vor allem stellten wir uns die Aufgabe, genau zu bestimmen, in welchem Grade die Reaktion überhaupt von der Gegenwart des Antigens abhängt.

Zu diesem Zweck haben wir eine Methode ausgearbeitet mit Benutzung langer Reihen von Röhrchen, in denen immer nur einer der bei der Reaktion beteiligten Faktoren willkürlich verändert wird, während alle übrigen Versuchsingredienzen in der ganzen Versuchsreihe keine Modifikation erfahren. An diesen Röhren können wir nicht nur den relativen Grad der in jeder Probe entstandenen Hämolyse ablesen, sondern auch ihre absolute Größe. Als Vergleichswert (100 %ige Hämolyse) dient die vollständige Auflösung derselben Menge roter Blutkörperchen (in derselben Flüssigkeitsmenge aufgeschwemmt), die in jedem Röhrchen der Kontrollprobe vorhanden ist. Wie wichtig die Anwendung einer solchen Methode ist, kommt erst deutlich zum Ausdruck, wenn man die relative hämolytische Kraft von verschiedenen Substanzen prüft. Man findet dann, wovon wir uns überzeugen konnten, daß die durch verschiedene Mengen irgendeines hämolytischen Agens hervorgerufene Hämolyse, in Prozentwerten berechnet, keineswegs konstant ist, sondern ganz bedeutend je nach den benutzten hämolytischen Körpern schwankt. So kann ein um 40 % verringertes Agens (Komplementserum) die Hämolyse um ca. 10 % herabsetzen, während dieselbe Schwächung einer anderen hämolysierenden Substanz (Komplement-Amboceptor) den Wert für die Blutkörperchenauflösung um mehr als 25 % erniedrigt.

Bei der Untersuchung der spezifischen Wirksamkeit des Antigens muß man von Anfang an die Tatsache unbedingt nicht außer acht lassen, daß die gewöhnlich benutzten Komplementmengen so klein sind, daß sie allein keine beachtenswerte Hämolyse hervorrufen, während doch das als Komplement angewandte normale Serum selbst ein schwaches hämolytisches System bildet. Analog besitzt das Antigen schon an und für sich eine schwache antihämolytische Kraft. Es wird bei den stereotyp angesetzten Reaktionsproben nur so schwach dosiert, daß es diese der Hämolyse entgegenwirkende Kraft nur minimal entfalten kann. Viele Unstimmigkeiten in den Untersuchungsergebnissen, die in der Praxis unterlaufen sind und nicht enträtselt werden konnten, beruhen wahrscheinlich auf der ungenügenden Beachtung dieser zwei wichtigen Tatsachen.

Die Wirkung des Antigens besteht, kurz gesagt, darin, daß es in einer gänzlich unspezifischen Weise die komplementbindende Tätigkeit des Serums erhöht. Dies zeigt sich in folgender Weise: Wenn wir bei einer sonst typischen Wassermannschen Reaktion nur ein sehr schwaches hämolytisches System benutzen (in viel größerer Verdünnung als im Normalversuch), so kommt die Reaktion ohne jede Verwendung von Antigen glatt zustande. Bei Gegenwart von Antigen ist ein viel stärkeres hämolytisches System erforderlich, um denselben Grad der Hämolyse zu erzeugen, der ohne Antigen zutage tritt. Das heißt also, die Komplementbindung ist zwar bei Anwesenheit von Antigen viel ausgesprochener, vollzieht sich aber doch in gewissem Umfange auch bei fehlendem Antigen.

Wenn das Serum eines unbehandelten Syphilitikers gegen ein normales Serum — nach Inaktivierung beider bei 56° — vergleichsweise geprüft wird, so zeigt sich, daß z. B. das syphilitische Serum 50 mal so stark antihämolytisch wirkt als das normale bei Gegenwart von Antigen. Derselbe Unterschied in ihrer Wirksamkeit wird sich geltend machen, wenn die beiden Seren ohne Antigen mit Hilfe eines genügend schwachen hämolytischen Systems geprüft werden.

Dies beweist ganz deutlich, daß das sogenannte Antigen kein unentbehrlicher Faktor bei der Wassermannschen Reaktion ist. Wir haben in einer Anzahl Seren von unbehandelten

Syphilisfällen gefunden, daß die relative antihämolytische Kraft des syphilitischen Serums im Vergleich zum normalen die gleiche ist, und derselbe Befund ergab sich, ob nun die Seren nach dem üblichen Schema untersucht wurden oder nach dem modifizierten bei fehlendem Antigen mit einer sehr schwachen Komplement-Amboceptor-Verbindung.

Wir sind jedoch noch weit entfernt, eine befriedigende Erklärung für die Rolle des Antigens geben zu können. Denn haben wir Seren von Syphilisfällen vor uns, die in Behandlung stehen, oder alte syphilitische Seren, die eine kürzere oder schon längere Zeit gelagert haben, so gelingt es nicht, die eben beschriebenen Resultate zu erzielen. Solche Seren weisen Unregelmäßigkeiten auf. Bei Anwesenheit von Antigen kann ein syphilitisches Serum 50 mal so wirksam sein wie ein normales. Untersuchen wir es dann nach unserer Methode ohne Antigen, so hat es nur noch die doppelte oder 3 fache Aktivität, ja in extremen Fällen sogar eine schwächere als ein normales Serum.

Ein anderes interessantes Moment bei solchen alten, konservierten syphilitischen Seren ist noch folgende Tatsache. Je stärker nämlich das von uns benutzte hämolytische System ist, um so näher kommt das normale Serum dem syphilitischen in bezug auf die Aktivität, wenn Antigen nicht vorhanden ist.

Wir sind vorläufig noch nicht in der Lage, diese Unregelmäßigkeiten der alten Seren und solcher von behandelten Fällen restlos zu erklären. Es liegen mehrere Möglichkeiten vor, die noch eines eingehenderen Studiums bedürfen.

So ist es denkbar, daß wir angesichts der stetigen Aktivitätsabnahme der spezifisch antihämolytischen Substanz durch Ausprobieren einen Punkt erreichen, wo der natürliche Amboceptor des nach Komplementzusatz reaktivierten Serums ein hinreichend starkes hämolytisches System bildet, um die verringerte antihämolytische Kraft des spezifisch syphilitischen Stoffes, welcher Natur er auch sein möge, zu übertreffen und lahm zu legen. Die Reaktion bleibt folglich aus, wenn nicht Antigen, das, wie oben ausgeführt, ein antihämolytisches Agens darstellt, hinzugefügt wird. Dasselbe würde auch, nur in beschränkterem Umfange, bei normalem Serum der Fall sein, da

es im Vergleich zum syphilitischen Serum die Hämolyse nur in geringem Grade zu hemmen vermag.

Die Bedeutung des Antigens bei der Wassermannschen Syphilisreaktion scheint unserer Meinung nach darin zu liegen, daß es erstens die von uns besprochenen Unregelmäßigkeiten ausgleicht, und zweitens, daß es die komplementbindende Fähigkeit des Serums verstärkt.

Das, worauf wir besonderen Nachdruck zu legen wünschen, ist die Tatsache, daß vom theoretischen Standpunkt aus das sogenannte „Antigen" kein wesentlicher Faktor bei der Wassermannschen Syphilisreaktion ist.

Zur Frage über die Beeinflussung der Wirkung von Medikamenten durch Lecithine.

Von

D. M. Lawrow.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der kaiserlichen Universität in Jurjew [Dorpat].)

(Eingegangen am 16. Juni 1913.)

Die jetzige Untersuchung bildet die Fortsetzung meiner in den Jahren 1910 und 1911 angestellten Versuche (s. die Arbeiten der Medizinischen Pirogoff-Gesellschaft an der Jurjewer Universität für die Jahre 1911 und 1912). Zuerst hat H. de Waele darauf hingewiesen, daß die Beeinflussung der physiologischen Wirkung verschiedener Substanzen durch die Lecithine abhängig ist von der Dosis, in der die Lecithine angewandt werden[1]). Der genannte Autor experimentierte an Kaninchen und Meerschweinchen; zu den Vergiftungen nahm er Coniin, Strychnin, Brucin und Cocain. Die Alkaloide wurden mit den Lecithinen zusammen eingeführt, und zwar nach vorherigem Vermischen im Mörser und nach 1 bis 2stündigem Stehen. Es erwies sich, daß geringe Lecithinquantitäten die Wirkung der Alkaloide begünstigten; größere Quantitäten, und zwar äquimolekulare, berechnet auf das gegebene Alkaloid resp. dessen Salz, oder dieselben übersteigende, hemmen die Wirkung der Alkaloide; bisweilen vernichten sie sogar die Wirkung.

H. de Waele prüfte die Lecithinwirkung auch bei Vergiftungen mit Diphtherietoxin und Ricin. Auch diese Versuche erwiesen, daß die erwähnten Lipoide ebenso auf diese Gifte wirken: kleine Dosen verstärken die Wirkung der genannten Toxine, größere Dosen hemmen dieselbe.

Somit wird die physiologische Wirkung wenigstens bestimmter Gifte durch die Lecithine augenscheinlich entsprechend

[1]) Zeitschr. f. Immunitätsforsch. u. experim. Therap. 3, 1909.

der Größe der Dosis, in der diese Lipoide angewandt werden, beeinflußt. Unsere ersten Versuche mit den Lecithinen, die im Jahre 1910 an Fröschen (Rana temporaria) angestellt wurden, haben uns auch gelehrt, daß die Beeinflussung der Wirkung bestimmter Medikamente, an Fröschen beobachtet, wesentlich abhängig ist von der Größe der angewandten Lecithindosis. Zur Vergiftung bedienten wir uns bei unseren erwähnten Versuchen folgender Substanzen: Strychnin (in Gaben 0,00033 bis 0,00125 g Strychn. nitric.), Curare, Äthylalkohol (in Gaben 0,4 bis 0,8 g), Chloralhydrat (in Gaben 0,01 bis 0,02 g), Phosphor (in Gaben 0,0003 bis 0,005 g), Phenol (in Gaben 0,0025 bis 0,004 g), Sublimat (in Gaben 0,001 bis 0,002 g), Äther sulfuric. (Narkose unter der Glasglocke). Die Lecithine wurden in Form von Emulsionen, gesondert von den genannten Substanzen, subcutan eingeführt, und zwar in folgenden Gaben:

Bei Strychnin	0,0012	bis	0,02 g	(81	Frösche)
„ Curare	0,0025	„	0,04 g	(58	„)
„ Alkohol	0,0050	„	0,05 g	(62	„)
„ Chloralhydrat . .	0,0012	„	0,02 g	(76	„)
„ Phosphor	0,0020	„	0,04 g	(80	„)
„ Phenol	0,0020	„	0,02 g	(34	„)
„ Sublimat	0,0200	„	0,08 g	(20	„)
„ Äther	0,0060	„	0,06 g	(30	„)

Die Lecithine wurden in der Weise angefertigt, daß Hühnereier mittels Äther extrahiert wurden. Zur Reinigung wurden die Lecithinätherlösungen wiederholt mittels Alkohol und Aceton ausgefällt. Die Frösche vertrugen dieses Lecithinpräparat bei Einführung von Dosen bis 0,6 g (= 0,2 × 3).

In der nachfolgenden Tabelle sind die Dosen zusammengestellt, in denen die Lecithine einen abschwächenden oder umgekehrt verstärkenden Einfluß auf die Wirkung dieses oder jenes der erwähnten Gifte hatten.

Substanz	Abschwächende Dosis	Verstärkende Dosis
Strychnin . . .	0,0012 bis 0,0025 g	0,0050 bis 0,02 g
Curare	0,0250 „ 0,0200 g	0,0200 „ 0,04 g
Äthylalkohol . .	0,0025 „ 0,0200 g	0,0400 „ 0,05 g
Chloralhydrat .	0,0025 „ 0,0050 g	0,0100 „ 0,02 g
Phosphor . . .	— —	0,0025 „ 0,04 g
Phenol	— —	0,0020 „ 0,01 g
Sublimat . . .	0,02 g	0,08 g
Äther	0,02 g	0,06 g

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, zeigten bei Phosphor- und Phenolvergiftungen die Lecithine in den genannten Gaben nur verstärkenden Einfluß auf die Wirkung dieser Gifte. Somit sind wir bei diesen unseren Versuchen auf zwei Gifte — Phosphor und Phenol — gestoßen, deren Wirkung durch die Lecithine augenscheinlich nur in verstärkendem Sinne beeinflußt wird, unabhängig davon, ob die Lecithine in kleinen, mittleren oder auch recht großen Gaben einverleibt wurden. Dieser Umstand veranlaßte uns, Versuche mit Agrostemma-Saponin, Resorcin und Campher anzustellen; wir erwarteten in ihnen Substanzen zu finden, deren physiologische Wirkung durch Lecithine ebenso beeinflußt wird, wie das bei Phosphor und Phenol der Fall war. Außerdem wurde auch Vergiftung mit Cantharidin angewandt. Die Versuche dieser Serie wurden an frischen Fröschen und solchen, die zu überwintern begonnen hatten, angestellt. Im ganzen wurden 15 Versuche an 363 Tieren gemacht. Resorcin wurde gegeben in Dosen von 0,0075 g bis 0,01 g; Campher 0,02 bis 0,04 g; Saponin 0,01 bis 0,02 g; Cantharidin (wässerige Lösung von cantharidinsaurem Kalium, oder ölige Lösung von Cantharidin) 0,0005 bis 0,002 g. Die Versuche ergaben folgende Resultate:

Substanz	Abschwächende Dosen	Verstärkende Dosen
Resorcin (102 Frösche)	?	0,005 bis 0,10 g
Agrostemma-Saponin (68 Frösche)	?	0,006 „ 0,05 g
Campher (43 Frösche)	?	0,006 „ 0,10 g
Cantharidin (150 Frösche) . . .	?	0,005 „ 0,10 g

Die Tabelle zeigt, daß bei Vergiftungen mit den erwähnten Giften die therapeutische Wirkung der in kleinen Gaben angewandten Lecithine unsicher war. Augenscheinlich ist bei diesen Giften der verstärkende Einfluß der Lecithine weit mehr ausgeprägt. Die unten beschriebenen Versuche mit Ricin wurden an Fröschen (Rana temporaria) angestellt. Bei diesen Versuchen beabsichtigten wir auch der Frage über die Abhängigkeit der Lecithinwirkung vom Allgemeinzustande der Tiere, und zwar von ihrem Ernährungszustande näher zu kommen. Zu den Versuchen wurden genommen entweder ganz frische Tiere, die eben eingefangen waren, oder solche, die im Labora-

torium mehrere Wochen zugebracht hatten (s. weiter unten), oder solche, die schon mehrere Monate überwintert hatten.

Die Lecithine wurden als Emulsionen, die mittels 0,6 %iger Kochsalzlösung hergestellt wurden, gesondert von der Ricinlösung eingeführt. Ricin wurde in einer Dosis genommen, die bei frischen Fröschen den Tod nach ca. 2 Wochen bewirkte. Zu den Versuchen wurden Frösche von ungefähr gleichem Gewicht gewählt.

Unmittelbar nach der Injektion von Ricin und Lecithin wurden die Frösche ohne Wasser in flachen Schalen unter großen Glastrichtern gehalten. Später wurde Wasser in die Schalen in dünner Schicht eingegossen; das Wasser wurde täglich gewechselt.

Die unter dem Versuch sich befindenden Frösche wurden bei Zimmertemperatur gehalten.

Die Versuche von E. Hanschmidt[1]), die an Kaninchen, Meerschweinchen, Hunden und Mäusen angestellt wurden, zeigen, daß der Einfluß der Lecithine auf die Wirkung verschiedener Arzneimittel resp. Gifte verschieden ist, und zwar, daß dieser Einfluß erstens von der pharmakodynamischen Natur des angewandten Mittels abhängig ist. Die Lecithine hemmten die Wirkung von Curare, Strychninnitrat, Äthylalkohol, Chloralhydrat, Veronalnatrium und Morphin; sie übten nur einen verstärkenden Einfluß bei Ricinvergiftungen (Mäuse) aus. Nach E. Hanschmidt ist der Einfluß der genannten Lipoide abhängig sowohl von der angewandten Dosis (s. Versuche mit Phosphor) als auch vom allgemeinen Zustande des Organismus resp. vom Gehalt desselben an Lipoiden.

A.

Versuch 1.

25. IV. 1912. Zum Versuch sind genommen 24 Frösche, die sich vom IX. 1911 im Institute befanden; je 6 Frösche in jeder einzelnen Serie.

10^h morgens wird den Fröschen je 1 ccm der Lecithinemulsionen subcutan in den Rücken injiziert.

---

[1]) D. Lawrow und W. Woronzow, Arch. internat. de Pharmacodynamie et de Thérapie 22, 392, 1912. — E. Hanschmidt, diese Zeitschr. 51, 171, 1913.

12h morgens wird je 1 ccm der Ricinlösung subcutan am Bauch injiziert.

Versuchstage	Kontrolle	Lecithin-Frösche		
		0,0015 g	0,003 g	0,006 g
2	–	+	–	–
4	–	++	–	–
5	–	++	++	+
6	+	++++	++++	+++
8	++	+++++	+++++	++++
9	+++	+++++	+++++	+++++
10	+++++	++++++	++++++	+++++

Versuch 2.

26. IV. 1912. Zum Versuch sind gewählt 30 Frösche, die im Institut vom IX. 1911 überwintert haben; je 6 Frösche zu jeder Versuchsserie.

10h morgens Injektion der Lecithinemulsionen, je 1 ccm subcutan, am Rücken.

12h je 1 ccm der Ricinlösung.

Versuchstage	Kontrolle	Lecithin-Frösche				
		0,006 g	0,012 g	0,025 g	0,05 g	0,1 g
1	–	–	–	–	+	–
2	–	+	–	–	+	–
3	–	++	++++	++++	+++	+++
4	–	++	++++	++++	++++	+++++
5	–	+++	++++	+++++	++++	+++++
6	++++	++++	+++++	+++++	++++	++++++
7	+++++	++++++	+++++	+++++	++++	

Versuch 3.

28. IV. 1912. 24 Frösche, je 12 auf jede Serie. Die Lecithinemulsion und Ricinlösung sind wie in den früheren Versuchen eingeführt.

Die Sterblichkeit ist in Prozenten ausgedrückt.

Lecithine wurden gegeben je 0,0005 g.

Versuchstage	Kontrolle	Lecithin-Frösche
2	—	8,3 %
3	16,6 %	33,3 %
4	25,0 %	50,0 %
5	50,0 %	50,0 %
6	50,0 %	66,0 %
7	75,0 %	100,0 %
8	100,0 %	—

Wie aus den Versuchen Nr. 1 bis 3 ersichtlich, vertragen Frösche, die überwintert haben, die Ricinvergiftung viel schlechter, wenn sie Lecithine erhalten, und zwar in Gaben von 0,0005 bis 0,1 g. Es ist klar, daß die erwähnten Lipoide diese Frösche in bezug auf Ricin sensibler machen, unabhängig von der Dosis, in der die Lecithine einverleibt sind, beginnend von einer sehr kleinen Dosis (0,0005 g) bis zu einer verhältnismäßig sehr hohen Dosis (0,1 g).

B.

Folgende Versuche sind an frischen Fröschen angestellt, d. h. an Fröschen, die eben gefangen wurden und 2 bis 3 Tage sich im Laboratorium befunden hatten.

Versuch 4.

13. IX. 1912. 60 frische Frösche, je 10 in jeder Serie.

Die Lecithine sind 4 Stunden vor dem Einverleiben der Ricinlösung eingeführt.

Sterblichkeit in Prozenten ausgedrückt.

Versuchstage	Kontrolle	Lecithin-Frösche				
		0,0005 g	0,00075 g	0,0015 g	0,003 g	0,1 g
	%	%	%	%	%	%
4	—	—	—	—	—	10
6	—	—	—	10	10	10
10	—	—	—	10	10	30
12	—	10	10	20	10	50
14	—	20	20	20	20	60
18	10	20	40	30	40	90
20	30	20	40	30	40	90
22	50	20	40	40	40	100
24	50	40	70	40	70	—
26	50	40	80	50	70	—
28	50	40	80	70	70	—
30	60	60	80	70	80	—
36	70	80	90	80	80	—
38	80	80	100	80	90	—

Dieser Versuch zeigt, daß 1. die Wirkung von Ricin an frischen Fröschen unter dem Einfluß von 0,00075 bis 0,003 g Lecithin und 0,1 g Lecithin verstärkt wird, besonders bei der zuletzt genannten Dosis; 2. 0,0005 g Lecithin zeigen keine konstante Wirkung; 3. selbst eine relativ so kleine Lecithinmenge wie 0,00075 g zeigt einen unzweifelhaften Einfluß auf die Ricinwirkung.

Versuch 5.

Dieser Versuch soll den vorigen ergänzen. Genommen sind 50 frische Frösche, je 10 in jeder Serie. Die Lecithinemulsionen sind 4 Stunden vor den Ricinlösungen eingeführt.

Sterblichkeit in Prozenten.

Versuchstage	Kontrolle %	Lecithin-Frösche 0,006 g %	0,012 g %	0,025 g %	0,05 g %
17	50	—	—	—	—
18	50	—	—	10	20
19	50	10	10	20	30
21	70	20	20	40	30
22	90	30	40	50	50
25	100	50	50	70	60
28	—	70	70	100	80
29	—	70	70	—	100
33	—	90	100	—	—

Dieser Versuch zeigt, daß die Lecithine in Gaben von 0,006 bis 0,05 g unzweifelhaft die Ricinwirkung abschwächten. Besonders stark trat diese Wirkung der Lecithine bei Gaben von 0,006 bis 0,012 g hervor.

Um diese schwächende Wirkung der Lecithine zu kontrollieren, wurde noch folgender Versuch angestellt (Vers. 6). Bei diesem Versuche wurden die Lipoide in einer Dosis von 0,0125 g einverleibt.

Versuch 6.

40 frische Frösche, je 20 in jeder Serie.

Versuchstage	7 %	9 %	11 %	13 %	14 %	15 %	17 %	18 %	21 %	24 %	30 %
Kontrolle	—	15	20	40	65	75	85	90	90	100	—
Lecithin-Frösche	10	10	15	15	25	25	30	35	60	85	90

Auch beim Versuch 6 erwiesen die Lecithine in der Dosis = 0,0125 g einen wesentlich abschwächenden Einfluß auf die Ricinwirkung. Somit beobachten wir bei der Anwendung von Lecithinen bei frischen Fröschen, die mit Ricin vergiftet werden, folgendes: 1. Lecithine in Gaben von 0,00075 bis 0,003 g be-

sitzen einen unzweifelhaft verstärkenden Einfluß auf die allgemeine toxische Wirkung des Ricins. 2. In der Dosis von 0,1 g verstärken diese Lipoide gleichfalls die Ricinwirkung, und 3. in mittelgroßen Gaben angewandt, nämlich in Dosen von 0,006 bis 0,05 g, schwächen die Lecithine in recht bedeutendem Grade die Ricinvergiftung ab. Wie aus den angeführten Daten ersichtlich, ist der Einfluß der Lecithine auf die allgemeine toxische Wirkung des Ricins bei frischen Fröschen (Rana temporaria) im wesentlichen abhängig von der Dosis, in welcher diese Lipoide eingeführt werden.

In dieser Beziehung können wir zwischen 3 Gruppen von Lecithingaben unterscheiden: a) kleine Gaben — wirken sensibilisierend; b) mittlere Gaben — wirken therapeutisch, und c) große Gaben — verstärken die Ricinwirkung.

Da bei den oben beschriebenen Versuchen auch verhältnismäßig große Lecithingaben angewandt wurden, haben wir einen besonderen Kontrollversuch angestellt, bei dem die Frösche — 10 Stück — Lecithine in Gaben von 0,1 g erhielten.

Versuch 7.

2. IX. 1912. 10 Frösche erhalten subcutan je 2 ccm einer 5%igen Lecithinemulsion (= 0,1 g).

3. IX. 1912. 2 ccm der Lecithinemulsion injiziert. Im Verhalten der Frösche ist nichts Abnormes bemerkbar.

5. IX. 1912. Injektion von 2 ccm Emulsion.

13. IX. 1912. Injektion von 2 ccm Emulsion.

15. IX. 1912. Injektion von 1 ccm Emulsion.

Nichts Abnormes konstatierbar.

Die Frösche wurden bis 2. XI. 1912 beobachtet, wobei sich nichts Abnormes an ihnen zeigte.

Folglich vertragen frisch gefangene Frösche die Lecithine in verhältnismäßig recht großen Gaben.

C.

Die weiter folgenden Versuche wurden angestellt, um den Einfluß des Überwinterns resp. des Hungerns auf die uns beschäftigende Lecithinwirkung zu klären. Zum Versuch 8 wurden Frösche verwandt, die in der zweiten Hälfte des Septembers gefangen waren.

Versuch 8.

26. X. 1912. 220 Frösche, je 20 Exemplare in jeder Versuchsserie. Die Lecithine sind etliche Stunden vor der Ricineinverleibung eingeführt.

Die Zahl der Todesfälle ist in Prozenten ausgedrückt.

Versuchstage	Kontrolle	Lecithin-Frösche									
		0,0005 g	0,00075 g	0,0015 g	0,003 g	0,006 g	0,012 g	0,025 g	0,05 g	0,1 g	0,2 g
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
7	5	5	—	—	5	—	5	15	—	15	30
9	5	25	10	—	10	—	10	30	10	25	50
11	20	30	15	5	15	5	15	55	25	30	60
13	25	50	35	15	30	10	45	55	45	65	90
15	55	80	55	40	45	35	75	75	65	80	95
17	65	90	90	45	55	60	85	80	85	90	95
19	80	90	100	80	70	75	95	90	90	90	100
21	80	100	—	95	80	95	95	95	90	95	—
23	80	—	—	100	90	100	95	95	95	95	—

Beim Versuch 8 wurden sehr verschiedene Lecithindosen angewandt: a) kleine = 0,0005 bis 0,00075 g; b) mittelgroße = 0,0015 bis 0,006 g und c) große = 0,012 bis 0,2 g. Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, gestaltet sich die Wirkung dieser erwähnten Gaben verschieden:

1. Gabe = 0,0005 g hat eine unzweifelhaft verstärkende Wirkung. 2. Gaben = 0,0015 bis 0,006 g wirkten im Laufe der ersten 19 Tage merklich abschwächend, dann zeigten sie jedoch verstärkende Wirkung. 3. Gaben = 0,012 bis 0,2 g Lecithin verstärkten deutlich die Wirkung des Ricins. Es hat sich also herausgestellt, daß die zu Überwintern beginnenden Frösche im allgemeinen empfindlicher den Lecithinen gegenüber sich erwiesen als die frischen Frösche: schon eine so kleine Lecithingabe wie 0,0005 g zeigte eine deutliche Wirkung. Und die Dosis von 0,0125 g, die bei den frischen Fröschen einen therapeutischen Effekt erzielte, erwies sich hier, bei den zu Überwintern beginnenden Fröschen, als „stark", schädigend, die Ricinwirkung verstärkend. Es scheint, daß bei solchen Fröschen die therapeutische Wirkung den Dosen 0,0015 bis 0,006 g zukommt; im allgemeinen sind jedoch auch diese therapeutischen Gaben für die erwähnten Frösche nicht so zuverlässig wie die therapeutischen Gaben, die für die frischen Frösche gelten.

Folglich reagieren die zu Überwintern beginnenden Frösche auf die Lecithinwirkung anders und verschieden von den frischen Fröschen (bei Ricinvergiftung). Und zwar sind die ersteren der verstärkenden Lecithinwirkung zugänglicher als der therapeutischen Wirkung.

Da bei diesem Versuche die Lecithindosis von 0,2 g angewandt war, so wurde noch ein Kontrollversuch in bezug auf diese Dosis angestellt (Versuch 9).

Versuch 9.

27. X. 1912. Es werden 10 Frösche von derselben Kollektion genommen, die zu dem Versuch 8 verwandt wurde. Injiziert wurden je 4 ccm einer 5 %igen Lecithinemulsion (2 ccm in den Rücken und 2 ccm in den Bauch). Die Frösche wurden bis zum 9. XII. 1912 beobachtet; jedoch war nichts Abnormes an ihnen bemerkbar.

Versuch 10.

Als Ergänzung zum Versuch 8 haben wir auch den Versuch 10 gemacht, und zwar an Fröschen, die längere Zeit überwintert hatten als die Frösche, deren wir uns in Versuch 8 bedienten.

Gewählt sind 250 Frösche, je 25 in jeder Serie. Diese Frösche waren in der zweiten Hälfte des Septembers gefangen. Der Versuch wurde begonnen am 5. XII. 1912. Lecithin ist 4 Stunden vor dem Ricin gegeben.

Versuchstage	Kontrolle	Lecithin-Frösche								
		0,0003 g	0,0005 g	0,0015 g	0,002 g	0,003 g	0,006 g	0,012 g	0,025 g	0,05 g
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
3	—	4	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	4	—	—	—	—	4	16	8	8
7	4	16	8	12	12	12	16	32	16	36
8	8	28	12	32	20	24	20	44	32	48
10	40	44	40	76	68	72	40	52	44	68
11	56	68	44	84	80	84	52	64	56	72
13	88	76	68	96	92	96	60	76	76	84
14	88	80	72	100	100	100	68	80	80	88
16	100	80	84	—	—	—	96	80	84	96
18	—	92	92	—	—	—	100	88	96	96

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, war der Einfluß der Lecithine auf die Wirkung des Ricins in Versuch 10 verschieden bei den verschiedenen Dosen der Lipoide. Im allgemeinen zeigte sich folgendes:

1. Lecithingaben von 0,0015 bis 0,003 g verstärkten deutlich die Wirkung des Ricins im Vergleich zur Kontrolle.

2. Die anderen Lecithindosen erzeugten zweierlei Wirkung: während der ersten 10 bis 11 Tage verstärkten sie die Ricinwirkung mehr oder weniger, später begannen sie die Ricinwirkung abzuschwächen.

Wir sehen also, daß bei Fröschen (Rana temporaria) die Lecithinwirkung auf die Ricinvergiftung wesentlich abhängig ist sowohl von der Größe der Lipoidgaben, als auch von dem Allgemeinzustande der Versuchstiere (einerseits die „frischen“ Frösche, andererseits solche, die schon mehr oder weniger lange Zeit überwintert hatten).

Am besten trat die Lipoidwirkung der Lecithine bei frischen Fröschen zutage.

Das Überwintern der Frösche, das mit Hungern verbunden ist, ändert die Lipoidwirkung auf die Ricinvergiftung. Bei den zu Überwintern beginnenden Fröschen begegnen wir noch therapeutischen Lecithindosen (0,0015 bis 0,006 g); diese Gaben sind aber geringer als die bei den frischen Fröschen. Bei Fröschen jedoch, die schon längere Zeit überwintert hatten, ist die therapeutische Wirkung der Lecithine augenscheinlich schwach ausgeprägt.

Über einen neuen Dialysator für analytische Zwecke.

Von

W. Kopaczewski.

(Aus dem Institut Pasteur, Paris.)

(Eingegangen am 17. Juni 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

In manchen Fällen stellt die Dialyse fast das einzige Mittel zur Reinigung und Darstellung gewisser Körper von kolloidaler Natur dar; ich erinnere nur an die Fermente und Toxine. Jedoch wird sie merkwürdigerweise nur sehr selten angewandt, und zwar aus zweifachen Gründen:

1. Handelt es sich um die schnelle Dialysierung, also in strömendem Wasser, so muß man eine außerordentliche Menge von Wasser anwenden, das in den Fällen, wo die Entfernung von Mineralstoffen der Hauptzweck ist, von größter Reinheit sein mußte. Nun verfügen aber viele Laboratorien nicht über eine so große Anzahl von Destillationsapparaten aus Silber oder Zinn, um z. B. täglich 15 l reinsten Wassers zu gewinnen.

2. Meistenteils mußte man sich nur auf die Gewinnung des undialysierbaren Stoffes beschränken; denn die dialysierenden Teile sind mit einem so großen Volumen Wasser verdünnt, daß es unmöglich ist, sie nachher daraus zu gewinnen; oft auch zersetzten sie sich während der Dialyse.

Während unserer Arbeiten über die Dialyse der Maltase[1]) hatten wir immer mit einem Mangel an geeignetem Wasser zu kämpfen, und konnten oft nicht die Dialyse mit strömendem Wasser durchführen. Andererseits zersetzte sich immer der dialysierte Teil der Maltase (Kohlenhydrate usw.) während

[1]) Sur la dialyse de la maltase. Compt. rend. de l'Acad. d. Sc., **156**, 918, 1913.

der Dialyse. Deshalb habe ich mir die Frage gestellt, ob es nicht möglich wäre, die Dialyse, Wasserdestillation und Konzentration des Dialysats zu vereinigen.

Nach vielen Fehlversuchen ist es gelungen, folgenden Apparat zu konstruieren, mit dem ich die Fachgenossen bekannt machen möchte (Fig. 1)[1]).

Aus der Figur ersieht man, daß der Apparat aus drei Teilen besteht, von denen alle drei sterilisierbar sind: *A*, *B*



und *C* im Autoklaven, *B* und *C* auch auf trockenem Wege (+ 180°).

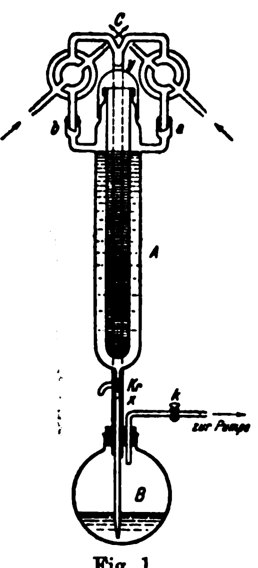


Fig. 1.

A stellt einen etwas modifizierten Dialysator vor; er ist so eingerichtet, daß man ihn mit einem Kollodiumsack, ohne oder mit einem Glasrohr, versehen kann. Unten trägt er ein Glasrohr mit Zweiweg-Hahn. Das Seitenrohr hat die Aufgabe, die Reinheit des Wassers zu prüfen (durch die Messung des elektrischen Leitvermögens) und, was daraus folgt, das Ende der Dialyse festzustellen. Das vertikale Rohr verbindet den Dialysator mit dem Kolben, der Hahn reguliert den Ausfluß des Wassers, so daß es immer auf dem gleichen Niveau im Dialysator steht.

B ist ein Kolben aus Jenaer Glas, der mit einem Korkpfropfen verstopft ist. Der letztere ist unten mit einer Scheibe aus Zinn versehen, um den direkten Kontakt des Wassers und des Pfropfens zu vermeiden. Durch den Pfropfen gehen 3 Röhren: eine erste von dem Dialysator, eine zweite zur Wasserpumpe und eine dritte aus Zinn zu den Kühlern.

C ist aus 2 Soxhletkühlern aus Zinn mit doppelter Wasserzirkulation gebildet, die mittels eines *Y*-Rohres, auch aus Zinn, verbunden sind.

Der Apparat funktioniert sehr einfach.

Man gießt in den Kolben *B* so viel Wasser ein, wieviel man aus dem zu dialysierenden Stoff bekommen will; man

[1]) Den Vertrieb des Apparats hat die Firma Pouleur frères in Paris angenommen.

verschließt ihn, biegt das Zinnrohr an den Stellen *X* und *Y* in der Weise, daß die Öffnungen der Kühler *a* und *b* in die Seitenarme des Dialysators gelangen.

Die Dialyse kann im luftverdünnten Raume — oder nicht — vorgenommen werden. Im ersten Falle öffnet man den Hahn *k* und stellt das Vakuum an; man schließt den Hahn zu, zündet den Brenner an und bringt die Flüssigkeit zum Sieden; dann reguliert man die Flamme so, daß sie die Siedetemperatur (ungefähr $+40^0$) nicht übersteigt.

Der Apparat produziert täglich 7 bis 8 l Wasser von der Leitfähigkeit $1{,}2—1{,}6 \cdot 10^{-6}$, wenn er bei gewöhnlicher Siedetemperatur arbeitet, 3 bis 4 l von der Leitfähigkeit $0{,}6—0{,}7 \cdot 10^{-6}$ bei der Temperatur $+40^0$. Wenn man beachtet, daß der Raum zwischen Kollodiumsack und Dialysatorwänden ungefähr 300 bis 400 ccm beträgt, so sieht man, daß sich das Wasser im Dialysator 10 bis 20 mal täglich erneut. So ist es nicht mehr merkwürdig, daß die Dialysezeit sich auf $^1/_2$ oder $^2/_3$ der gewöhnlichen reduziert[1]).

Ein praktischer Vorteil des Apparates liegt noch darin, daß er auch als gewöhnlicher Destillationsapparat für reines Wasser dienen kann. Dazu schließt man nur den Hahn *kr* zu, füllt den Kolben *B* mit destilliertem Wasser und sammelt das reine Wasser im Dialysator; von Zeit zu Zeit öffnet man den Hahn und stellt die Verbindung zwischen dem Dialysator und dem Seitenrohr her, um das zweifach destillierte Wasser zu sammeln.

---

[1]) Wir haben z. B. die Pectase und Pectin dialysiert, einerseits in unserem Dialysator, andererseits in einem einfachen (in letzterem Falle wechselte man das Wasser 3 mal täglich). Um die Pectase und Pectin von der Leitfähigkeit von ungefähr $2{,}8 \cdot 10^{-6}$ zu bekommen, dialysierten wir im ersten Falle 2 bis 3 Tage lang, im zweiten 3 bis 5 Tage.

Über den stickstoffhaltigen Bestandteil des Kephalins.

Von

A. Baumann.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 20. Juni 1913.)

Über die basischen Bestandteile des Kephalins liegen folgende Untersuchungen vor:

Thudichum[1]) fand bei der Spaltung des Kephalins[2]) mit Baryt drei Basen, die er als Chlorplatinate trennte und untersuchte. Das eine entsprach in seiner Zusammensetzung dem Chloroplatinat des Cholins; aus der Mutterlauge dieses Salzes krystallisierte dann ein zweites Salz, aus dessen Zusammensetzung Thudichum die Formel

$$2\,(C_2H_7NO.HCl) + PtCl_4$$

berechnete. Er bemerkt dazu: „Man könnte die im Salz enthaltene Base als Dimethylamin betrachten, in dem das dritte Atom Wassserstoff durch Hydroxyl vertreten ist, oder man könnte es auch als Oxäthylamin erklären (Formeln), also als einen aus Neurin (Cholin) durch den Verlust von drei Radikalen Methyl und einem Radikal Wasser gebildeten Körper."

Das Chlorplatinat der dritten Base Thudichums krystallisierte nicht; aus den analytischen Daten läßt sich keine plausible Formel berechnen.

---

[1]) Thudichum, Die chemische Konstitution des Gehirns der Menschen und der Tiere. Tübingen 1901, S. 145 ff.

[2]) Thudichum arbeitete mit Material, das aus Menschenhirn und aus Rinderhirn gewonnen war; er gibt nicht an, von welcher Tiergattung das hier verarbeitete Kephalin stammte. Man muß also auch mit der Möglichkeit rechnen, daß ein Gemisch von Kephalin aus Menschenhirn und aus Rinderhirn hydrolysiert wurde.

Thudichum läßt die Frage offen, ob die zwei Basen ursprüngliche Bestandteile des Kephalins sind oder durch Zersetzung des Cholins sich gebildet haben.

W. Koch[1]), der Kephalin aus Schafhirn untersuchte, fand nach Barytspaltung kein Cholin, dagegen „eine kleine Menge eines Körpers, dessen Platinsalz annähernd die Zusammensetzung eines Monomethyloxäthylamins besaß, dessen Menge jedoch zur weiteren Reinigung nicht genügte.“ Die Eigenschaften dieses Salzes beschreibt Koch nicht.

Koch hat auch versucht, durch Bestimmung der im Kephalin am Stickstoff gebundenen Methylgruppen über die im Kephalin enthaltene Base Aufschluß zu erlangen: er fand für jedes Stickstoffatom ein — bei 240° abspaltbares Methyl.

Cousin[2]) fand bei der Hydrolyse seiner Kephalinpräparate aus Rinderhirn mit Salzsäure nur Cholin; er betrachtet die anderen Basen Thudichums als Zersetzungsprodukte des Cholins. Sigmund Fränkel und E. Neubauer[3]) führten Bestimmungen des N-Methyls an drei Kephalinpräparaten aus. In ihrem Präparat A, das sie als Reinkephalin bezeichnen, fanden sie das Verhältnis des Stickstoffs zu dem N-Methyl annähernd wie 1:1; in dem Präparat B, aus welchem durch Fällung mit Salzsäure in wässeriger Lösung das Präparat A hervorgegangen war, das Verhältnis $N/N.CH_3$ wie 1:1,91; in dem Präparat C, das nach ähnlicher Reinigung wie die vorherigen durch Aussalzung aus wässeriger Lösung gewonnen wurde, betrug der Wert von $N/N.CH_3$ 1:2,8 bis 1:3,44[4]). Trotz dieser widersprechenden Befunde schließen sich die Autoren der Ansicht Kochs an, daß im Kephalin jedem Atom Stickstoff eine Methylgruppe entspricht.

Bei mehreren Hydrolysen des Kephalins aus Menschenhirn, die mit Barytlauge nach der von Parnas[5]) beschriebenen Methode ausgeführt worden sind, konnte die im Kephalin ent-

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 136, 1902.

[2]) Journ. de Pharm. et de Chim. [6] 25, 177 bis 180, 1907.

[3]) Diese Zeitschr. 21, 332 bis 334, 1909.

[4]) Diese Zahlen sind aus den Daten berechnet, die sich in der Arbeit von Sigmund Fränkel und E. Neubauer vorfinden: Fränkel und Neubauer geben auf Grund derselben Daten andere Rechnungsresultate an.

[5]) Diese Zeitschr. 22, 411, 1909.

haltene Base nicht isoliert werden; es war aber sicher festzustellen, daß dabei kein Cholin abgespalten wurde.

Erst bei einer planmäßigen Aufarbeitung derjenigen wasserlöslichen Produkte, die bei der Aufspaltung von Kephalin[1]) mit verdünnten Säuren entstehen, gewannen wir Anhaltspunkte über die Natur der Kephalinbase. Wir bestimmten in deren wässeriger Lösung den primären Aminostickstoff nach D. van Slyke[2]): es ergab sich, daß fast sämtlicher Stickstoff des Kephalins als wasserlösliche primäre Base vorlag. Dasselbe ergab sich, als wir im nicht hydrolisierten Kephalin den primären Aminostickstoff bestimmten.

Die Base des Kephalins mußte also eine primäre Base sein; da sie im Kephalin sehr fest, nicht salzartig gebunden ist, so war nicht an ein einfaches Amin zu denken, sondern an eine Aminosäure oder ein hydroxyliertes Amin. Es war naheliegend, auf Grund des Befundes von Thudichum auf das Vorhandensein von Oxäthylamin (Aminoäthylalkohol) zu schließen, das von Trier[3]) im Bohnensamenlecithin und im käuflichen Lecithin (Merck) gefunden worden ist.

Wir arbeiteten die wasserlöslichen Produkte einer Hydrolyse des Kephalins mit Schwefelsäure zunächst in der von Trier für die Lecithinhydrolyse angegebenen Weise auf; wir gewannen dabei kein Cholin, wohl aber gelang es uns, eine geringe Menge des Oxäthylamins in Form seines Chloraurats zu isolieren, zu reinigen und durch Analyse sowie nach Schmelzpunkt und anderen Eigenschaften sicher zu identifizieren. Weit besser gestaltete sich die Ausbeute bei einer beschränkten Hydrolyse mit Salzsäure: hier wurden mehr als 25 % des in Lösung gegangenen Stickstoffs als reines Chloraurat des Oxäthylamins isoliert, auch der Rest des Stickstoffs erwies sich als einer primären Base angehörig.

Es ergab sich die Frage, ob das Oxäthylamin ein im Kephalin präformierter oder durch sekundäre Zersetzungen des Cholins entstandener Körper sei: diese zweite Möglichkeit ist

---

[1]) Es ist hier wie im folgenden stets von Kephalin aus Menschenhirn die Rede, das aus in Aceton gehärtetem und im Vakuum getrocknetem Material nach der Methode von Parnas dargestellt wurde (l. c.).

[2]) Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden. 5, II, 95ff.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 383, 1911; 76, 498, 1912.

von Thudichum erwogen, von Cousin behauptet worden. Da im ungespaltenen Kephalin primärer Aminostickstoff enthalten ist, erscheint die Vermutung Cousins unwahrscheinlich; wir überzeugten uns auch in einem besonderen Versuch, daß nach langdauernder Behandlung von Cholin mit 20$^0/_0$ Schwefelsäure kein nach D. van Slyke bestimmbarer Aminostickstoff auftrat.

Nach diesen Befunden halten wir es für erwiesen, daß die im Kephalin aus Menschenhirnen enthaltene Base eine primäre Base ist, wahrscheinlich zum größten Teil oder ausschließlich Oxäthylamin.

Wir befinden uns damit zunächst im Widerspruch mit den Angaben derjenigen Forscher, die im Kephalin Cholin und Methylimidgruppen gefunden haben. Als wir die Angaben über das Vorkommen von Methylimidgruppen im Kephalin an unserem Präparat nachprüften, fanden wir, daß auch nicht eine Spur von (nach Meyer und Herzig bestimmbaren) Methylimid darin vorhanden war. Wir wollen auf Grund dieser Befunde weder den Angaben Kochs, der Schafhirn-Kephalin untersuchte, noch jenen Cousins, der Rinderhirn gebrauchte, widersprechen: diese Frage bedarf einer vergleichenden Untersuchung. Der Befund von Thudichum könnte sich erklären, wenn man annimmt, daß dieser Forscher ein Gemisch von Rinder- und Menschen-Kephalin verarbeitet hat. Dagegen stehen unsere — am Menschenkephalin gewonnenen — Resultate mit den Schlußfolgerungen von Fränkel und Neubauer in unlösbarem Widerspruch.

Experimentelles.

Versuch 1.

Hydrolyse des Kephalins mit Schwefelsäure.

50 g Kephalin wurden in 300 ccm Wasser unter Verreiben aufgelöst und mit 150 g konz. Schwefelsäure in 650 ccm Wasser versetzt, die Flüssigkeit etwa 30 Stunden lang bei 60° in Kohlensäureatmosphäre unter dauerndem Turbinieren hydrolisiert. Dabei färbte sich die Flüssigkeit allmählich braun. Nach dem Erkalten wurde die erstarrte Masse der Fettsäuren und ausgeschiedenen Melanine abgesaugt und mit Wasser wiederholt ausgezogen, das Waschwasser mit dem Filtrat vereinigt.

Die vereinigten Filtrate betrugen 1490 ccm; je 10 ccm wurden nach D. van Slyke analysiert.

1. 10 ccm liefern bei 19° und 767 mm 9,8 ccm N_2,
entsprechend 5,66 mg N,

2. 10 ccm liefern bei 20° und 764 mm 9,9 ccm N_2,
entsprechend 5,66 mg N.

Die gesamte Flüssigkeit enthält demnach 0,844 g primären Aminostickstoff. Die angewandte Kephalinmenge enthielt 1,1 g Stickstoff; im festen Hydrolysenrückstand (nach Extraktion der alkohollöslichen Fettsäuren 2,7 g) fanden sich 0,11 g N.

3. 0,1110 g verbrauchen nach Kjeldahl 3,3 ccm 0,1 n-Säure: 4,16 % N. Es wurden also von den 1,1 g N des Kephalins 0,8 g als primärer Aminostickstoff und 0,1 g als Melaninstickstoff wiedergewonnen.

Aus der wässerigen Lösung der Spaltungsprodukte wurde die Schwefelsäure mit Baryt, das Baryt mit Kohlensäure entfernt; dann wurde sie eingedampft und die Glycerinphosphorsäure mit basischem Bleiacetat ausgefällt. Das Blei wurde mit Schwefelwasserstoff gefällt, das Filtrat durch Luftdurchleitung von Schwefelwasserstoff befreit, dann eingedampft, das Eindampfen unter Zusatz von Alkohol und Salzsäure wiederholt. Der Rückstand wurde mehrmals mit abs. Alkohol ausgezogen. Auf Zusatz von alkoholischer Sublimatlösung fiel in der Kälte nur ein äußerst spärlicher Niederschlag aus; nach Entfernung des Quecksilbers und des Schwefelwasserstoffs wurde eingedampft, mit abs. Alkohol aufgenommen: nun fiel auf Zusatz von Platinchlorid (in Alkohol) wieder nur ein sehr geringer Niederschlag. Das Platin wurde entfernt, die Lösung eingedampft und über einen Monat im Exsiccator aufbewahrt: der Sirup krystallisierte nicht. Auf Zusatz von Goldchlorid in sehr konzentrierter Lösung krystallisierte in der sirupösen Masse ein Chloraurat aus, das sich beim Stehen im Exsiccator langsam vermehrte. Nach 10 Tagen wurde die zähe Flüssigkeit scharf abgesaugt, auf gehärtetem Papier abgepreßt, mit Salzsäure gewaschen, abgesaugt und getrocknet. Die Hälfte des grünstichiggelben Krystallpulvers, das metallisches Gold enthielt, wurde aus Essigester umkrystallisiert. Das auskrystallisierte Chloraurat war wieder mit Goldflittern verunreinigt: die Menge betrug 50 mg.

Um Anhaltspunkte über die Zusammensetzung zu gewinnen, ließen wir die mit Gold verunreinigte Substanz analysieren (Mikroanalyse nach Prof. F. Pregl):

3,794 mg (710 mm; 18°): 0,116 ccm N_2
= 3,35 % N.

6,678 mg (707 mm; 18°): 0,200 ccm N_2
= 3,27 % N.

5,724 mg: 3,098 mg Au[1]); 1,00 mg H_2O; 1,20 mg CO_2
= 54,12 % Au; 1,96 % H; 5,72 % C.

7,622 mg: 4,21 mg Au
= 55,23 % Au.

Das Ergebnis der Analyse des unreinen Salzes ist zunächst, daß sich darin C:N verhält, wie 1,993:1; es wurde wahrscheinlich, daß die untersuchte Substanz das Chloraurat des Oxäthylamins war. Die Substanz war, wie erwähnt, mit Goldflittern verunreinigt; wir versuchten, die Substanzmengen der Analysen folgendermaßen zu korrigieren:

Der Goldgehalt des Oxäthylaminchloraurats beträgt 49,24 %; gefunden wurden 55,23 % Au. Wir nehmen also an, daß die Substanz 5,99 % metallisches Gold enthielt. Zieht man diese Menge von den Ausgangsmengen der Analysen ab, so ergeben sich folgende Werte:

6,076 mg (707 mm; 18°): 0,200 ccm N_2
5,381 mg : 1,00 mg H_2O; 1,20 mg CO_2.

Gefunden: N: 3,59 %; C: 6,08 %; H: 2,07 %;
Berechnet: N: 3,51 %; C: 6,03 %; H: 2,01 % für $C_2H_8NOAuCl_4$.

Die übriggebliebene Menge des Goldsalzes (40 mg), welche nicht aus Essigester umkrystallisiert war, wurde nun in sehr wenig verdünnter Salzsäure aufgelöst, filtriert und die Lösung in einem kleinen hohen Gläschen im Exsiccator verdunstet. Das Salz krystallisierte in großen Krystallen von der Farbe des Kaliumplatinchlorids aus: die Mutterlauge wurde vorsichtig mit Filtrierpapier abgetupft, dann weiter getrocknet.

Die so gewonnenen Krystalle (30 mg) enthielten außer Gold keine anorganischen Verunreinigungen: nach Verbrennen auf dem Spatel färbte der Rückstand die Flamme überhaupt

[1]) Bei dem Verbrennen gewonnener, zu niedriger Wert.

nicht. Die Krystalle schmolzen bei 188 bis 189^0 zu einer roten Flüssigkeit, die nach dem Erkalten zu einer gelben Krystallmasse wieder erstarrte; der Schmelzpunkt stimmt also vorzüglich mit dem des reinen Oxäthylaminchloraurats, welchen Knorr zu ca. 190^0[1]) angibt. Eine Mischprobe mit synthetischem Oxäthylaminchloraurat ergab die Identität der beiden Körper. Bei langsamem Erhitzen schmilzt unser Chloraurat ebenso wie das künstliche bei 183 bis 185^0; bei längerem Erhitzen entwickelt die Schmelze langsam Gasblasen.

Herr Dr. Wecker (München) hatte die Güte, die Krystalle zu untersuchen; er schreibt uns darüber:

Das Salz bildet kurze Prismen, bis über 1 mm groß, von einer ausgesprochenen Spaltbarkeit nach ihrer Längsrichtung (messerklingenförmige Spaltstücke). Sie sind pleochroitisch, und zwar hell grünlichgelb bei annähernd paralleler Lage ihrer Längsseite zur Schwingungsrichtung des Polarisators, dunkel rötlichgelb bei nahezu senkrechter Lage. Sie löschen schief aus, sind optisch zweiachsig und besitzen starke Doppelbrechung von negativem Charakter. Die Substanz ist wahrscheinlich triklin. Der Vergleich mit dem Chloraurat von synthetischem Oxäthylamin ergab krystallographische Identität beider Substanzen.

Analyse nach Prof. Pregl:

8,423 mg: 4,128 mg Au; 1,61 mg H_2O; 1,93 mg CO_2;
6,137 mg (718 mm, 20^0): 0,200 ccm N_2.

Gefunden: N: 3,59 %; C: 6,25 %; H: 2,14 %; Au: 49,01 %;
Berechnet: N: 3,51 %; C: 6,03 %; H: 2,01 %; Au: 49,24 %.

Versuch 2.

Hydrolyse des Kephalins mit Salzsäure.

75 g Kephalin wurden in 250 ccm Wasser gelöst und mit 550 ccm konz. Salzsäure versetzt; die Mischung wurde in einem Kolben unter Quecksilberverschluß und starkem Rühren bei 50 bis 60^0 40 Stunden lang gehalten. Nach Entfernung der festen Produkte wurde die wässerige Flüssigkeit bis auf 150 ccm eingedampft, mit Natronlauge neutralisiert und dann genau so behandelt, wie die Flüssigkeit im Versuch 1 nach der Ent-

[1]) Ber. 30, I, 913, 1897.

fernung der Schwefelsäure und des Baryts; sie verhielt sich fast genau wie im Versuch 1. Vor dem Zusatz von Goldchlorid wurde die Substanz auf 20 ccm verdünnt, davon 2 ccm entnommen, auf 12 ccm verdünnt und zu einer Bestimmung nach van Slyke benutzt.

10 ccm Lösung (762 mm, 22°): 33 ccm N_2
= 18,6 mg N.

Die Gesamtmenge enthält demnach 0,223 g N.

Die Lösung wurde eingedampft und der Sirup mit Goldchlorid versetzt; es krystallisierten sofort braungelbe harte Krystalle in Krusten aus. Sie wurden über Asbest abgesaugt, mit verdünnter Salzsäure gewaschen, im Exsiccator getrocknet; es wurden so 1,7 g Chloraurat erhalten.

Die Krystalle wurden aus verdünnter Salzsäure umkrystallisiert; wir erhielten sie in der gleichen Weise wie die im Versuch 1 beschriebenen rein und mit dem richtigen Schmelzpunkt in der Ausbeute von 1,3 g.

Aus der ersten Mutterlauge krystallisierte noch eine kleine Menge derselben Krystalle; außerdem enthielt diese Mutterlauge eine dunkle Schmiere, die nach Verdünnen mit Wasser vollständig ausfiel. Nach Entfernung des Goldes mit H_2S wurde in den vereinigten Mutterlaugen der Gesamtstickstoff und der primäre Aminostickstoff bestimmt.

Volumen der Lösung: 250 ccm.

10 ccm Lösung (763 mm, 20°): 10,7 ccm N_2
= 6,11 mg N.

Die Lösung enthält also 0,153 g primären Aminostickstoff.

25 ccm der Lösung verbrauchen nach Kjeldahl 11,9 ccm 0,1 n-Säure
= 16,66 mg N.

Die Lösung enthält im ganzen 0,166 g N.

Wir sehen hier, daß in der Restlösung der Aminostickstoff 92% des Gesamtstickstoffs beträgt. Die Ausgangslösung enthielt 0,223 g Aminostickstoff, davon wurden im Goldsalz 0,065 g N gefunden, der Rest ist ganz vorwiegend ebenfalls primärer Aminostickstoff.

Versuch 3.

10 g Kephalin wurden in 150 ccm heißem Wasser gelöst und in eine Mischung von 150 ccm Wasser mit 60 g Schwefelsäure eingetragen. Die Hydrolyse vollzog sich bei 50 bis 55° 30 Stunden lang. Von den ausgeschiedenen Fettsäuren wurde abgesaugt, das klare Filtrat auf 500 ccm gebracht.

Bestimmung nach van Slyke:

1. 5 ccm (763 mm, 21°): 2,40 ccm N_2
= 0,0014 g N.

2. 5 ccm (763 mm, 21°): 2,30 ccm N_2
= 0,0013 g N.

Die Gesamtmenge des abgespaltenen Aminostickstoffs beträgt also 0,137 g (Mittelwert).

Gesamtstickstoff nach Kjeldahl:

1. 50 ccm Lösung verbrauchen 10,30 ccm 0,1 n-Säure.
2. 50 ccm Lösung verbrauchen 10,00 ccm 0,1 n-Säure.

Die Gesamtmenge des abgespaltenen Stickstoffs beträgt also 0,14 bis 0,144 g.

Wir haben uns überzeugt, daß Aminoäthylalkohol mit salpetriger Säure bei Anwendung des van Slykeschen Verfahrens reagiert und bestätigen die darauf bezüglichen Angaben von G. Trier[1]).

Versuch 4.

Zur Prüfung der Frage, ob bei der Säurehydrolyse aus Cholin primäre Basen entstehen können, haben wir Cholinchlorhydrat mit 20%iger Schwefelsäure bei 50 bis 60° 40 Stunden lang erhitzt. Die Schwefelsäure wurde mit Baryt, der Baryt mit Kohlensäure entfernt, die Lösung eingedampft (mit Salzsäure) und von dem krystallisierten Rückstand 0,1487 g in 20 ccm Wasser gelöst.

Bestimmung nach van Slyke:

10 ccm Lösung (763 mm, 19°): 0,3 ccm N_2.
0,07435 g: 0,0002 g N.

Das angewandte Cholinchlorhydrat gab folgende Werte:

0,0285 g (768 mm, 24°): 0,3 ccm N_2.

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 1913 (Heft vom 14. Juni).

Es ergibt sich also, daß keine Zunahme des nach van Slyke bestimmbaren Stickstoffs nachweisbar ist.

Wir haben auch die Frage geprüft, ob nicht Oxäthylamin bei Bestimmungen von Methylimidgruppen nach Meyer und Herzig durch Reduktion der Äthoxylgruppe und deren nachträgliche Abspaltung als Jodäthyl zu Fehlern Anlaß gibt. Wir haben bei Verwendung von synthetischem Oxäthylamin (Kahlbaum) zu Methylimidbestimmungen geringe Mengen Jodsilber erhalten, die etwa einem Zehntel der unter obiger Annahme berechneten Menge darstellten; indessen schreiben wir dieses Resultat den Verunreinigungen des Oxäthylamins zu, da wir bei den entsprechenden Bestimmungen am Kephalin (die Jodhydrate wurden bis 340° erhitzt) überhaupt keine Ausscheidung von Jodsilber bekommen haben.

Bestimmung des primären Aminostickstoffs am Kephalin.

Bestimmung des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl: 1,98 g Kephalin verbrauchen 26 ccm 0,1 n-Säure, entsprechend 1,84 % N. Bestimmung des primären Stickstoffs nach van Slyke: 0,9 g Kephalin werden in Wasser unter Zusatz von Alkali gelöst und auf 50 ccm verdünnt; davon geben

10 ccm (763 mm, 21°): 5,3 ccm N_2
= 1,63 % N.

Zusammenfassung.

Es wird nachgewiesen, daß der Stickstoff des Kephalins einer primären Base angehört und daß die primäre Aminogruppe bereits im Kephalin enthalten ist. Als das basische Spaltungsprodukt des Kephalins wird das Oxäthylamin isoliert und identifiziert.

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Herrn Dr. Parnas unternommen, der mich bei deren Ausführung durch Rat und Tat unterstützte.

Zur Kenntnis der Hypophysenenzyme.

Von

Lucie Buetow.

(Aus der ersten inneren [Direktor: Prof. Dr. L. Kuttner] und der chemischen [Vorsteher: Prof. Dr. W. Löb] Abteilung des Virchow-Krankenhauses zu Berlin.)

(Eingegangen am 20. Juni 1913.)

Über die Bedeutung der Hypophyse im Organismus ist bisher noch wenig bekannt.

Während der Drüse von einigen Autoren jegliche Funktion abgesprochen und sie als ein in Involution begriffenes Organ bezeichnet wird, behaupten andere, daß ihr eigene spezifische Funktion zukomme. Gestützt wird diese Annahme durch die Beziehungen, in der die Akromegalie mit der Hypophyse steht. P. Marie[1]) hat zuerst das Krankheitsbild der Akromegalie beschrieben und auf das Vorkommen des Hypophysentumors aufmerksam gemacht. Er hat späterhin die Akromegalie auf eine Überfunktion der Hypophyse zurückgeführt.

Neuerdings haben andere Autoren wie Borchardt[2]) und Biedl[3]) bestätigt, daß sich bei Akromegalie immer Veränderungen in der Hypophyse finden. Während bei der Akromegalie, bei der sich übrigens in etwa 40% der Fälle Glucosurie finden soll (Borchardt)[4]) eine Hyperfunktion angenommen wird, glaubt man, daß es sich bei der Fettsucht mit Hypoplasie des Genitalapparates um eine Hypofunktion handelt (Fröhlich)[5]).

Ferner hat man gefunden, daß es bei Schilddrüsenhypoplasie zur Vergrößerung der Hypophyse kommt und umgekehrt bei mangelhafter Hypophysenentwicklung zur Vergrößerung der Schilddrüse[6]).

---

[1]) Zitiert nach Borchardt, Beihefte zur med. Klinik, 7. Jahrg., Heft 5, S. 132/33.

[2]) Borchardt, Ergebn. d. inn. Med. **1909**, Heft 3, S. 344.

[3]) Biedl, Innere Sekretion S. 305, 1910.

[4]) Borchardt, Beihefte zur med. Klinik, 7. Jahrg., Heft 5, S. 134.

[5]) Fröhlich, Wiener klin. Rundschau **1901**, Nr. 47.

[6]) v. Fürth, Probleme der physiol. u. pathol. Chem. **1**: Gewebschemie S. 487.

Man hatte geglaubt, in dem Hypophysin das spezifische Sekret gefunden zu haben. Dies wirkt sehr stark blutdrucksteigernd. Wegen seiner erregenden Wirkung auf die glatte Muskulatur wird es besonders als wehenerregendes Mittel angewandt. Auffallend ist jedoch, daß der Hypophysenextrakt gar nicht aus dem drüsigen Teil der Hypophyse, sondern aus dem Infundibularteil stammt.

Um das Tatsachenmaterial über die Hypophyse zu vermehren, habe ich mich als Assistentin an der ersten inneren Abteilung des Virchow-Krankenhauses auf der chemischen Abteilung des Krankenhauses mit einer Untersuchung der in der Hypophyse wirksamen Fermente beschäftigt.

Wie W. Löb[1]) in seiner Arbeit über die Ovarien ausführt, kann man in jedem drüsigen Organ zweierlei Arten von Enzymen unterscheiden, erstens solche, die allein für den Stoffwechsel des Organs an sich da sind und die man, wie es scheint, in allen drüsigen Organen wiederfindet, und zweitens solche, denen spezifische Funktionen im Gesamtorganismus zukommen. Es mag auch darauf hingewiesen werden, daß gerade die Kenntnis der in einem Organe tätigen Enzyme für die Erforschung der Hormone von Bedeutung ist. Diese von den Organen produzierten Stoffe, deren Wirksamkeit sich auf den ganzen Organismus erstrecken kann, entstehen zweifellos durch regulierte biologische Reaktionen. Es liegt nahe anzunehmen, daß auch an der Erzeugung der Hormone durch Spaltung größerer Molekülkomplexe oder durch Synthese die Enzyme wesentlich beteiligt sind, so daß die Kenntnis der in einem bestimmten Organe vorhandenen Enzyme einen Tatsachenkomplex bildet, der mit einer ganzen Reihe wichtiger Probleme in engem Zusammenhang steht. Wenn dies so ist, so darf man annehmen, daß die Funktion der einzelnen Organe auch in ihrem Gehalt an Enzymen zum Ausdruck kommt.

Da wir nun in der Hypophyse, wie aus der Arbeit zu ersehen ist, nicht nur nicht quantitativ (im Verhältnis zur Größe des Organs) eine Abnahme der Fermente finden, sondern sich auch solche Enzyme nachweisen lassen, die man vielleicht als spezifische ansprechen könnte, so können wir daraus den Rückschluß ziehen, daß es sich hier nicht um ein in Involution begriffenes Organ handelt.

---

[1]) Walther Löb und S. Gutmann, Zur Kenntnis der Enzyme der Ovarien. Diese Zeitschr. 41, Heft 6, S. 445.

Das Präparat wurde Herrn Professor Löb von der Chemischen Fabrik Rhenania zur Verfügung gestellt. Die blutfrei gewaschenen Organe von Pferden wurden nach dem Trocknen bei niederer Temperatur von Fett befreit und in Fleischmühlen zu einem grobkörnigen Pulver zerkleinert. Der wässerige und der alkoholische Auszug erwiesen sich als blutfrei.

Da die meisten Enzyme zwar wasserlöslich sind, ohne daß sie sich in jedem Falle leicht aus Organpulvern extrahieren lassen, so wurden die meisten Versuche sowohl mit dem ursprünglichen Pulver als auch mit wässerigen Extrakten ausgeführt. Zur Herstellung der Extrakte wurde das Pulver mit dem Lösungsmittel auf einer Schüttelmaschine bestimmte Zeit geschüttelt und die Mischung nötigenfalls nach Zentrifugieren klar filtriert.

Bei allen Versuchen wurde die Sterilität durch Zusatz von 1 Vol.-Proz. Toluol gewahrt, das sich bei kürzeren Versuchen als ausreichend bewährt hat, ohne die Enzymwirkung zu schädigen.

Experimenteller Teil.

Katalase und Peroxydase.

Während die Peroxydase nicht den vorhererwähnten allgemeinen Zellenzymen zuzurechnen ist, scheint dies bei der Katalase, deren Wirkung bekanntlich darin besteht, Hydroperoxyd in Sauerstoff und Wasser zu zerlegen, ohne daß Oxydationsprozesse dabei auftreten, der Fall zu sein.

Wie schon erwähnt, findet sich die Katalase in allen Organen, aber die Mengenverteilung in den Organen ist eine außerordentlich verschiedene. Am meisten soll die Leber enthalten, am wenigsten Muskulatur und Gehirn. Auch die verschiedenen Tierarten verhalten sich in bezug auf die Menge des Ferments sehr verschieden. Nach einer Zusammenstellung von Battelli und Stern[1]) finden sich folgende, durch 1 ccm Blut aus 1 $^0/_0$iger Wasserstoffsuperoxydlösung entwickelte Sauerstoffmengen:

---

[1]) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Spezieller Teil, S. 397.

Mensch	9200
Pferd	3900
Rind	3500
Taube	140
Frosch	400
Natter	13700
Viper	8700

Zur Prüfung des Hypophysenpräparates wurden 5 g Substanz mit 100 ccm Aqu. dest. und 1 ccm Toluol $^1/_2$ Stunde auf der Schüttelmaschine geschüttelt, filtriert und etwas von der Lösung mit einigen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd versetzt. Es tritt eine verhältnismäßig geringe Gasbildung ein. Die Prüfung auf Peroxydase mittels Aloin ist positiv.

Eine kleine Menge der festen Substanz, mit Wasserstoffsuperoxyd versetzt, gibt sehr starke Sauerstoffentwicklung.

Katalase und Peroxydase sind vorhanden.

Diastase.

Auch die Diastase dürfte den allgemeinen Zellenzymen zuzuzählen sein. Aus der bis jetzt stets gefundenen gleichen Beeinflussung der Stärke und des Glykogens durch dieselben Diastaselösungen kann man den Schluß ziehen, daß eine Art Diastase sowohl die pflanzliche wie die tierische Stärke zu verzuckern vermag. Bekanntlich findet sich Diastase vor allem im Speichel und im Pankreas, ferner im Blut, in Lymphe und Galle, in der Leber und in der Milz; von Fischer und Niebel[1]) ist sie im Kropf, Hoden und in der Schilddrüse nachgewiesen worden, von Löb[2]) in den Ovarien. Auch im Mageninhalt findet man häufig diastatisches Ferment; doch ist dies nicht im Magensekret vorhanden, sondern vermutlich durch Rückfluß aus dem Duodenum in den Magen gelangt.

a) Spaltung der Stärke.

Die Lösungen wurden in der Zusammensetzung, die die nachfolgende Tabelle gibt, 24 Stunden im Brutschrank gehalten, dann filtriert. 40 ccm wurden mit 5 ccm kolloidaler Eisen-

---

[1]) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Spezieller Teil 1910, S. 107.

[2]) Walther Löb u. S. Gutmann, diese Zeitschr. 41, Heft 6, S. 447.

hydroxydlösung enteiweißt, mit 1 ccm Magnesiumsulfat versetzt und auf 50 ccm aufgefüllt.

In der Tabelle I wurde die Zuckerbestimmung mittels der Polarisation ausgeführt, in der Tabelle II mittels der Bangschen und Bertrandschen Methode.

Tabelle I.

Nummer	Zusammensetzung der Mischung	Polarisationswerte in Graden	
1	0,5 %ige Stärkelösung 50 ccm Pulver 0,5 g Toluol 0,5 ccm	1,12	0,88
2	Aqu. dest. 50 ccm Pulver 0,5 g Toluol 0,5 ccm	0,0	0,0
3	0,5 %ige Stärkelösung 50 ccm Toluol 0,5 ccm	0,52	0,6

Tabelle II.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Bestimmung nach Bang		Osazon	Bestimmung nach Bertrand	
		Hydroxylamin	Zucker g		Kaliumpermanganlösg. verwandt	Zucker g
1	0,5 %ige Stärkelösung 50 ccm Pulver 0,5 g Toluol 0,5 ccm	36,5	0,0085	reichlich	5,05 5,35	0,00825 0,00895
2	Aqu. dest 50 ccm Pulver 0,5 g Toluol 0,5 ccm	46,5	0	nicht	1,8	0
3	0,5 %ige Stärkelösung 50 ccm Toluol 0,5 ccm	43,5	0,0029	nicht	2,0	0,0005

5 g Pulver werden mit 100 ccm Aqu. dest. und 1 ccm Toluol ½ Stunde auf der Schüttelmaschine geschüttelt, zentrifugiert, filtriert, davon

0,5 ccm
1,0 „
2,0 „
3,0 „

mit 5 ccm 1 %iger Stärkelösung versetzt und 24 Stunden im Brutschrank gehalten. Dann wird 1 Tropfen Jodlösung hinzugesetzt. Es tritt keine Bläuung ein.

Der Versuch wird wiederholt mit

0,1 ccm d. ob. Mischg., dazu	1 ccm	1 %ig. Stärkelös.	++	m. Jod	hellgelbe	Farbe
0,1 „ „ „ „ „	2 „	„ „	+	„ „	„	„
0,1 „ „ „ „ „	4 „	„ „	Grenze	„ „	violette	„
0,1 „ „ „ „ „	8 „	„ „	—	„ „	blaue	„
0,1 „ „ „ „ „	16 „	„ „	—	„ „	„	„
0,1 „ „ „ „ „	32 „	„ „	—	„ „	„	„

Diastase ist vorhanden.

Der Diastasewert ist nach dem letzten Versuch nach der Wohlgemuthschen Zählung 800.

b) Spaltung des Glykogens.

Die Versuche wurden in derselben Weise wie oben ausgeführt, d. h. nachdem die Lösungen (Zusammensetzung siehe in der Tabelle) 24 Stunden im Brutschrank von 37° gehalten waren, wurden sie filtriert; 40 ccm mit 5 ccm kolloidaler Eisenhydroxydlösung enteiweißt; der Zuckergehalt von 5 ccm wurde mittels der Bangschen Methode bestimmt. 50 ccm der Kupferlösung entsprachen 45,5 ccm Hydroxylaminlösung.

Tabelle III.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Verbrauch an Hydroxylamin	Zucker g	Osazon
1	Glykogen 0,2 g Pulver 0,5 g Aqu. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	42,3 42,15	0,0027 0,0028	reichlich
2	Pulver 0,5 g Aqu. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	45,4 44,4	0 0,001	nicht
3	Glykogen 0,2 g Aqu. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	46,0 45,5	0 0	nicht

Invertase.

Im tierischen Organismus findet sich Invertase im Darmsaft; sie fehlt nach Oppenheimer[1]) im Magensaft, Speichel und Pankreas und soll auch im Blute normalerweise nicht vorkommen.

Die Versuche wurden wie die obigen ausgeführt. Die Bestimmung des Zuckers wurde mit der Bangschen und Bertrandschen Methode gemacht.

[1]) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Spezieller Teil, S. 40, 1910.

Tabelle IV.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Verbrauch an Hydroxylamin nach 2 Tagen	Verbrauch an Hydroxylamin nach 4 Tagen	Zucker in g nach 2 Tagen	Zucker in g nach 4 Tagen	Osazon
1	Pulver 0,5 g Rohrzucker 0,25 g	44,1	37,5	0,0022	0,0076	spärlich
	Aqu. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	45,6	44,6	0,0	0,0016	
2	Pulver 0,5 g Aqu. dest. 50 ccm	44,1	45,2	0,022	0,0011	nicht
	Toluol 0,5 ccm	44,7	44,7	0,0013	0,0013	
3	Rohrzucker 0,5 g Aqu. dest. 50 ccm	45,2	45,2	0,0011	0,0011	nicht
	Toluol 0,5 ccm	46,0	45,8	0,0	0,0	

Tabelle V.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Verbrauch an Kaliumpermanganatlösung nach 2 Tagen	Verbrauch an Kaliumpermanganatlösung nach 4 Tagen	Zucker in g nach 2 Tagen	Zucker in g nach 4 Tagen
1	Pulver 0,5 g	2,1	2,3	0,0005	0,001
	Rohrzucker 0,25 g Aqu. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	1,9	2,1	0,0	0,0005
2	Pulver 0,5 g Aqu. dest. 50 ccm	1,8	1,8	0,0	0,0
	Toluol 0,5 ccm	2,0	1,9	0,00025	0,0
3	Rohrzucker 0,25 g Aqu. dest. 50 ccm	2,0	2,4	0,00025	0,00125
	Toluol 0,5 ccm	2,0	1,8	0,00025	0,0

Invertase ist nicht vorhanden.

Lactase.

Auch die Lactase dürfte zu den speziellen Enzymen gehören. Sie spaltet bekanntlich Milchzucker in Glucose und Galaktose. Im tierischen Organismus kommt Lactase im Darm junger Tiere vor. Bei Diarrhöen soll sie auch bei Erwachsenen auftreten. Sonst soll sie in keinem anderen Organ vorkommen[1]).

[1]) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Spezieller Teil.

0,5 g Pulver wurden mit 50 ccm 1 $^0/_0$iger Milchzuckerlösung gemischt und 0,5 ccm Toluol hinzugesetzt, 24 Stunden im Brutschrank belassen, dann wurden 25 ccm des Filtrats mit 10 ccm Eisenhydroxydlösung und 5 ccm Magnesiumsulfat enteiweißt, und das Filtrat im Gärungsröhrchen angesetzt. Zur Kontrolle der Hefewirksamkeit wurde ein Gärungsröhrchen mit Traubenzuckerlösung und etwas Hefe beschickt. Nach 24 bzw. 48 Stunden bei 37^0 war in dem mit Milchzucker beschickten Gärungsröhrchen nur eine ganz geringe Gasbildung vorhanden, während im Kontrollröhrchen starke Gärung eingetreten war.

Lactase ist nicht vorhanden.

Glykolyse.

Das glykolytische Ferment soll die Fähigkeit besitzen, Traubenzucker, Mannose, Galaktose, Fructose und Maltose zu zerstören. Die meisten Arbeiten, die über Glykolyse gemacht worden sind, beschränken sich darauf, die Zerstörung von Zucker festzustellen.

Nach Löb[1]) muß man den Begriff der Glykolyse auf alle exothermen, mit oder ohne Sauerstoff eintretenden Spaltungen des Zuckermoleküls beschränken, d. h. auf alle Vorgänge, bei deren Ablauf dem lebenden Organismus Energie zur Verfügung gestellt wird. Hierzu gehört die vollständige oder teilweise Oxydation des Zuckers, ferner Spaltungsvorgänge, wie Milchsäuregärung und alkoholische Gärung.

Über das Vorkommen des glykolytischen Ferments im Organismus sind die Ansichten noch geteilt. Während von einigen Autoren das Vorkommen eines glykolytischen Ferments im Blute behauptet wird, wird von anderen Autoren dies bestritten[2]); ebenso verhält es sich mit dem glykolytischen Ferment im Pankreas und in der Leber[3]), deren Verhalten durch ihre Beziehung zum Diabetes mellitus besonders von Interesse ist. Auf die Untersuchung der Hypophyse bezüglich eines in ihr wirksamen glykolytischen Ferments weist, wie schon in der Einleitung bemerkt, die Tatsache hin, daß in 40$^0/_0$ der Fälle von Akromegalie Glucosurie auftritt. Es könnte auch hier, wie bei

---

[1]) Walther Löb, Beiträge zur Frage der Glykolyse. I. Diese Zeitschr. 29, 137, 1910.

[2]) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, S. 488, 1910.

[3]) S. Rosenberg, Med. Klin. 1912, Nr. 42 bis 45, Sonderabdruck S. 4.

der Erkrankung des Pankreas, eine Beziehung zwischen Hyperfunktion und Störung der Zuckerverbrennung vorhanden sein.

2 g Pulver werden mit 50 ccm 2 %iger Traubenzuckerlösung gemischt; hinzugefügt wurden 50 ccm Aqu. dest. + 1 ccm Toluol, sodann filtriert und ein Teil (25 ccm) mit 10 ccm Eisenhydroxydlösung und 5 ccm Magnesiumsulfat sofort enteiweißt, dann wurde auf 50 ccm aufgefüllt. 5 ccm wurden zur Bestimmung nach Bertrand benutzt. Das übrige wurde 2 bis 4 Tage im Brutschrank gehalten und dann ebenso verfahren. Es zeigte sich dabei eine geringe Zunahme des Kaliumpermanganatverbrauchs, welches wahrscheinlich auf die Entstehung nicht kolloidaler, oxydierbarer Eiweißspaltprodukte zurückzuführen ist.

Tabelle VI.

Nummer	1. Tag		2. Tag		3. Tag		4. Tag		5. Tag	
	Kalium-permang.-Lösung ccm	Zucker g	Kalium-permang.-Lösung ccm	Zucker g	Kalium-permang.-Lösung ccm	Zucker g	Kalium-permang.-Lösung ccm	Zucker g	Kalium-permang.-Lösung ccm	Zucker g
1	8,24	0,01578	9,0	0,0183	8,40	0,01659	—	—	—	—
2	8,00	0,01510	8,9	0,0178	8,35	0,01649	—	—	—	—
3	8,35	0,01609	—	—	—	—	9,4	0,01913	9,9	0,0205
4	8,35	0,01609	—	—	—	—	9,2	0,01910	9,9	0,0205

Ein glykolytisches Ferment ist danach nicht vorhanden.

Lipase.

Man unterscheidet sogenannte echte Lipasen als solche, die echte Neutralfette in Glycerin und Fettsäure spalten können, neben esterspaltenden Fermenten, die nur die Fähigkeit haben, Esterverbindungen niedriger Fettsäuren zu spalten (einfache Ester, z. B. Monobutyrin). Wie aus dem folgenden ersichtlich, findet sich in der Hypophyse keine echte Lipase, sondern nur ein esterspaltendes Ferment (Esterase).

Die echte Lipase kommt hauptsächlich im Pankreas, aber auch im Duodenum und im Magen, Lunge und Leber vor, während im Blute nur eine Esterase festgestellt ist.

Zur Entscheidung über die Gegenwart von Lipase und Esterase im Hypophysenpräparat wurde in folgender Weise verfahren:

1. 1 Teelöffel Butter wird mit 50 ccm Äther verrührt. Reaktion neutral. Dann wird filtriert, der Äther abgedampft. Je 5 ccm dieser Butter werden mit 0,5 g Pulver, die in 10 ccm Aq. dest. suspendiert sind, zusammengebracht.

Ein Teil wird gekocht, ein Teil bleibt ungekocht. Dann wird 1 Tropfen 1 $^0/_0$ ige Rosolsäure und soviel 1 $^0/_0$ ige Na_2CO_3-Lösung zugesetzt, bis Rotfärbung eintritt. Das Gekochte sah nach Zusatz von 3,5 ccm Na_2CO_3 rosa gefärbt aus, das Ungekochte wurde bei etwa 4 ccm Na_2CO_3 Zusatz rötlich. Nach 24 Stunden war das Resultat wie bei den angesetzten Kontrollproben negativ. Es war keine Säure entstanden.

2. 0,2 g Pulver, 2,0 ccm Aq. dest. } ungekocht	0,2 g Pulver, 2,0 ccm Aq. dest. } gekocht
1,0 „ Tributyrin	1,0 „ Tributyrin
5,0 „ Aq. dest.	5,0 „ Aq. dest.
2 Tropfen Rosolsäure	2 Tropfen Rosolsäure.

Bis zur Rotfärbung wurden bei dem ungekochten Teil 4,3 ccm, bei dem gekochten Teil 1,92 ccm 1 $^0/_0$ ige Na_2CO_3-Lösung verbraucht.

Nach 1 Stunde bei Zimmertemperatur trat schon bei dem ungekochten Teil Gelbfärbung auf. Nach 24 Stunden wurden 33,25 ccm 1 $^0/_0$ ige Na_2CO_3-Lösung zur Neutralisation verbraucht, während die gekochte Probe neutral blieb.

Tributyrinase ist vorhanden.

Pepsin.

Das Pepsin, das ja durch sein hauptsächliches Vorkommen im Magen am leichtesten der Forschung zugänglich war, ist im Organismus allgemein verbreitet.

Zum Nachweis des Pepsinferments wurde zunächst Casein benutzt, das in den unten angegebenen Mengenverhältnissen zusammen mit der Hypophysensubstanz 24 Stunden im Brutschrank bei 37 ^{0} gehalten wurde. Nach 24 Stunden reagierte das Pulver und Casein enthaltende Filtrat schwach sauer; die beiden andern Filtrate waren neutral. Das Pulver und Casein enthaltende Filtrat zeigte deutlich Biuretreaktion. Das nur Pulver enthaltende Filtrat zeigte kaum merkliche, das Casein enthaltende ganz schwache Biuretreaktion.

Je 10 ccm der Filtrate wurden nach **Kjeldahl** geprüft.

Tabelle VII.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Verbrauchte $^{n}/_{10}$-H_2SO_4 in ccm		
1	Pulver 0,5 g Casein 0,5 g Aq. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	7,15	4,3	4,4
2	Pulver 0,5 g Aq. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	4,70	2,1	1,9
3	Casein 0,5 g Aq. dest. 50 ccm Toluol 0,5 ccm	0,85	1,4	0,8

Ferner wurde die Edestinprobe angestellt. 2,5 g Pulver wurden mit 50 ccm Aq. dest. 1 Stunde auf der Schüttelmaschine geschüttelt, dann zentrifugiert und filtriert. 10 ccm davon wurden auf 100 ccm Aq. dest. verdünnt. Davon wurden 9 ccm mit 1 ccm n-Salzsäure vermischt und in dem untenstehenden Mengenverhältnis mit $^{n}/_{30}$-HCl verdünnt, $^{1}/_{2}$ Stunde im Brutschrank bei 37° gehalten und dann mit je 6 Tropfen gesättigter Kochsalzlösung versetzt.

a) Eigenverdauung:

Von der oben angegebenen Mischung	$^{n}/_{30}$-HCl	
0,1 ccm	2 ccm	. . . verdaut
0,2 „	2 „	. . . „
0,4 „	2 „	. . . „
0,6 „	2 „	. . . „
0,8 „	2 „	. . . Trübung
1,0 „	2 „	. . . unverdaut
2,0 „	2 „	. . . „

b) Mit Edestin:

Von der oben angegebenen Mischung	$^{1}/_{1000}$-Edestinlösung	
0,1 ccm	2 ccm	. . . nicht verdaut
0,2 „	2 „	. . . „ „
0,4 „	2 „	. . . „ „
0,6 „	2 „	. . . schwache Trübung
0,8 „	2 „	. . . „ „
1,0 „	2 „	. . . verdaut
2,0 „	2 „	. . . „

Pepsin ist vorhanden.

Trypsin.

Das Trypsin spaltet ebenfalls die Eiweißkörper, wirkt aber im Gegensatz zum Pepsin nur bei schwach alkalischer Reaktion. Trypsin findet sich im Pankreas, und zwar als Trypsinogen, und wird in den Darm sezerniert. Ein tryptisches Ferment findet sich auch in den Leukocyten. Zum Nachweis des Trypsins wurde die Bildung von Tyrosin aus Seidenpepton benutzt. 5 ccm einer $20\,^0/_0$igen Seidenpeptonlösung wurden mit 0,5 g Pulver und einigen Tropfen $0{,}2\,^0/_0$iger Sodalösung versetzt, bis schwache alkalische Reaktion auftrat, und nach Zugabe von 0,1 ccm Toluol 24 Stunden im Brutschrank bei 37^0 gehalten. Nach Zugabe von einigen Tropfen Essigsäure wurde aufgekocht, heiß filtriert, eingedampft und mit alkoholischem Ammoniak mehrmals ausgezogen, eingedampft, filtriert und stark abgekühlt. Es entstanden Tyrosinkrystalle.

Auch die Neubauersche Probe auf Tryptophanbildung verlief positiv.

Trypsin ist vorhanden.

Urease und Desamidase.

Unter desamidierenden Fermenten versteht man solche, die Körper mit der Bindung CO — NH aufspalten. Hierher rechnet man die Säureamide und besonders die Aminosäuren. Die Versuche wurden mit Glykokoll ausgeführt, wobei aber nicht sicher Ammoniakspaltung nachzuweisen war.

Auch die Urease gehört zu den desamidierenden Enzymen, und zwar zerlegt das Ferment Harnstoff in Kohlensäure und Ammoniak. Das Enzym findet sich nach Lea[1]) im Harn besonders bei ammoniakalischer Cystitis, und zwar im schleimigen Bodensatz, nicht aber in dem Filtrat nach Alkoholfällung. Es soll indiffusibel sein. Auch soll es an die lebenden Zellen gebunden sein, während von andern Autoren behauptet wird, daß es sich nur dann findet, wenn harnstoffzersetzende Pilze vorhanden sind.

Die Versuche wurden in dem unten angegebenen Mengenverhältnis angestellt. Die Mischungen wurden 5 bis 7 Tage im Brutschrank gehalten. Nach Verlauf dieser Zeit wurden 100 ccm

---

[1]) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. S. 164.

der Filtrate mit 25 ccm kolloidaler Eisenlösung und 4 ccm Magnesiumsulfat enteiweißt. 50 ccm der Filtrate wurden unter Zusatz von Wasser und Magnesia usta zur Ammoniakbestimmung benutzt.

Tabelle VIII.

Nr.	Zusammensetzung der Mischung	Verbrauchte $^n/_{10}$-H_2SO_4 bis zur Neutralisation des Ammoniaks			
		nach 5 Tagen		nach 7 Tagen	
1	Pulver 3 g Aq. dest. 150 ccm Toluol 1,5 ccm	0,5	0,3	0,85	0,5
2	Pulver 3 g Aq. dest. 150 ccm Glykokoll 0,5 g Toluol 1,5 ccm	1,2	1,9	1,2	0,8
3	Pulver 3 g Aq. dest. 150 ccm Harnstoff 0,5 g Toluol 1,5 ccm	4,0	4,1	7,9	5,8

Die Versuche sind mit dem gleichen Resultat mehrfach wiederholt worden.

Demnach fehlt Desamidase, während Urease vorhanden ist.

Zusammenfassung.

Aus den vorliegenden Versuchen hat sich ergeben, daß in der Hypophyse von allgemeinen Zellenzymen vorhanden sind: Katalase, Diastase, Pepsin, Trypsin. Außerdem finden sich Peroxydase, Tributyrinase und Urease, die vielleicht als spezielle Organenzyme bei den Funktionen der Hypophyse eine Rolle spielen. Nicht vorhanden sind: Invertase, Lactase, glykolytisches Ferment und Desamidase.

Eine neue Makro- und Mikromethode zur quantitativen Bestimmung des Chlors im Blute.

Von

H. Rogée und C. Fritsch.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten zu Mannheim.)

(Eingegangen am 21. Juni 1913.)

Die Bestimmung des Chlors im Blute wurde bisher fast immer nach vorausgegangener Veraschung des Blutes und Titration nach der Volhardschen Restmethode ausgeführt. Dieses Verfahren gibt gewiß zuverlässige Resultate, es hat aber den Nachteil, daß es sehr zeitraubend ist und deshalb für Serienuntersuchungen nicht in Betracht kommen kann. Es erscheint darum erwünscht, Methoden ausfindig zu machen, die die Bestimmung des Chlorgehalts im Blute einfacher gestalten. Einen Fortschritt in dieser Richtung bedeutet das von K. O. Larsson in dieser Zeitschrift (49, 479) veröffentlichte Verfahren. Larsson zeigte, daß bei geeigneter Enteiweißung das Chlor quantitativ ins Filtrat geht. Er gibt an, das Blut zu enteiweißen, indem man es mit heißer Magnesiumsulfatlösung und Essigsäure versetzt, die Mischung bis zur Beendigung der Koagulation in heißes Wasser stellt, mit Blutkohle schüttelt und im klaren Filtrat die Chlorbestimmung nach Mohr vornimmt. Da diese Methode erst in einigen Stunden das Resultat liefert, und die völlig beendete Koagulation, ohne deren gutes Gelingen die Bestimmungen unsicher werden, nicht ganz leicht zu erkennen ist, haben wir Versuche angestellt, in ähnlicher Weise, d. h. nach Entfernung des Bluteiweißes zum Ziel zu gelangen, und zwar benutzten wir zur Enteiweißung des Blutes die bekannte und bewährte Eisenmethode von Michaelis und Rona. Es gelang in der Tat, in der restierenden klaren Flüssigkeit das Chlor direkt nach Mohr zu bestimmen und nur eine

Schwierigkeit galt es zu überwinden: Der Liquor Ferri oxydati dialysati, bekanntlich aus Eisenchloridlösung und Ammoniakflüssigkeit durch Dialyse dargestellt, enthält, selbst wenn er mit wenig Silbernitratlösung direkt keine Fällung liefert, doch stets noch Chlorverbindungen, die durch Dialyse nicht entfernt werden können. Wie wir gefunden haben, läßt sich der dadurch bedingte Fehler jedoch ausschalten, stellt man neben der eigentlichen Bestimmung einen sog. blinden Versuch (ohne Blut) an, in dem man das kolloidale Eisen ebenfalls mit Magnesium koaguliert. Dann hat man nur nötig, die bei dem blinden Versuch verbrauchten Kubikzentimeter Silbernitratlösung von den bei der eigentlichen Bestimmung erhaltenen in Abzug zu bringen, um das Chlor der Eisenhydroxydlösung auszuschalten. Versuche, die wir mit reinen Kochsalzlösungen verschiedener Stärke anstellten, bestätigten, daß der eingeschlagene Weg zum Ziel führt. Wir bestimmten in den Kochsalzlösungen durch direkte Titrierung das Natriumchlorid, dann nach Behandlung mit kolloidaler Eisenhydroxydlösung und Magnesiumsulfat. Wie aus nachstehenden Angaben ersichtlich, erhielten wir durchaus befriedigende Resultate, die uns zu Versuchen mit Blut berechtigten. Wir fanden nämlich:

	Direkte Titration	Neues Verfahren
1.	0,493 % NaCl	0,495 %
2.	0,672 % "	0,674 %
3.	0,899 % "	0,899 %

Sodann haben wir in verschiedenen Blutproben die Chloride nach vorausgegangener Veraschung durch Titration nach Volhard bestimmt und gleichzeitig die Chlorbestimmungen nach unserem Verfahren gemacht, dabei viele Bestimmungen doppelt ausgeführt. Die beiden nebenstehenden Tabellen geben über die Brauchbarkeit der Methode Aufschluß.

Die gefundenen Werte sind demnach als gut übereinstimmende zu bezeichnen. Da die Methode genau, sehr einfach und in kurzer Zeit auszuführen ist — in etwa einer halben Stunde — bietet sie große Vorteile gegenüber der Veraschung, die doch mindestens einen halben Tag in Anspruch nimmt, auch gegenüber der Methode von Larsson, die immerhin einige Stunden währt.

Tabelle I.

Nr.	Blut von	Veraschung und Titration nach Volhard		Neues Verfahren	
		angewendete Blutmenge	Cl als %-NaCl berechnet	angewendete Blutmenge	Cl als %-NaCl berechnet
1	Pferd (Serum)	10 ccm	0,475	10 ccm	0,478
2	Hammel	10,199 g	0,517	10,271 g	0,521
3	do.	10,199 „	0,517	9,100 „	0,517
4	do.	10,199 „	0,517	10,124 „	0,520
5	do.	10,199 „	0,517	10,293 „	0,518
6	Pferd (Serum)	10 ccm	0,464	10 ccm	0,464
7	do.	10 „	0,464	10 „	0,464
8	do.	10 „	0,464	10 „	0,464
9	do.	10 „	0,464	10 „	0,464
10	Kaninchen	8,221 g	0,557	8,326 g	0,557
11	Hammel	9,089 „	0,552	8,902 „	0,553
12	do.	9,089 „	0,552	9,612 „	0,556
13	do.	9,089 „	0,552	9,812 „	0,553
14	do.	9,586 „	0,508	9,721 „	0,507
15	Mensch	8,008 „	0,448	9,343 „	0,450
16	do.	8,008 „	0,448	9,556 „	0,447
17	do.	9,219 „	0,415	9,700 „	0,419
18	do.	9,219 „	0,415	9,959 „	0,417

Tabelle II.

Nr.	Veraschung	Neues Verfahren (Mittlere Werte)
1	0,475	0,478
2	0,517	0,519
3	0,464	0,464
4	0,557	0,557
5	0,552	0,554
6	0,508	0,507
7	0,448	0,448
8	0,415	0,418
	3,936	3,945
	3,936 : 8 = 0,492	3,945 : 8 = 0,493

Hiernach beträgt die größte Abweichung 0,62%, die Durchschnittsdifferenz 0,2%.

Die praktische Ausführung unseres Verfahrens gestaltet sich wie folgt:

In einem 250-ccm-Kolben werden ca. 10 ccm Blut genau abgewogen und mit etwa 150 ccm Wasser verdünnt; man gibt darauf mit einer genauen Pipette 50 ccm Liquor Ferri oxydati dialysati und dann 5 ccm einer 20%igen Magnesiumsulfatlösung hinzu, füllt mit Wasser bis zur Marke auf und schüttelt einige Sekunden kräftig durch. Man läßt einige Minuten stehen, fil-

triert durch ein Faltenfilter in ein trockenes Kölbchen und bestimmt in genau 100 ccm des wasserklaren Filtrats die Chloride nach Mohr mit $^n/_{10}$-Silbernitratlösung bei Gegenwart von neutralem Kaliumchromat als Indicator.

Vorher stellt man in analoger Weise einen blinden Versuch — ohne Blut — an und zieht die verbrauchten Kubikzentimeter Silberlösung vom eigentlichen Versuch ab.

Beispiel.

Es wurden 9,036 g Blut verwendet, 150 ccm Wasser, 50 ccm Liquor Ferri oxydati, 5 ccm Magnesiumsulfatlösung (20%ig) zugegeben, mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt, umgeschüttelt und nach einigem Stehen durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Bei der Titration von 100 ccm des klaren Filtrats wurden 17,3 ccm $^n/_{10}$-Silbernitratlösung gebraucht.

Beim blinden Versuch werden 50 ccm Liquor Ferri oxydati, 150 ccm Wasser, 5 ccm Magnesiumsulfatlösung mit Wasser auf 250 ccm aufgefüllt, umgeschüttelt und nach einigem Stehen durch ein trockenes Faltenfilter filtriert. Bei der Titration von 100 ccm des klaren Filtrates wurden 14,1 ccm $^n/_{10}$-Silbernitratlösung gebraucht. Es sind also von den 17,3 ccm $AgNO_3$ 14,1 ccm in Abzug zu bringen = 3,2 ccm. Da das Ganze auf 250 ccm verdünnt wurde, wir aber nur 100 ccm zur Titration verbrauchten, so sind jene $3{,}2 \times 2{,}5$ zu nehmen = 8,00. 1 ccm Silbernitratlösung = 0,0058 NaCl, 8,00 = 0,0464. Diese Menge enthalten 9,036 g Blut, 100 also $\frac{0{,}0464 \times 100}{9{,}036} = 0{,}513$.

Bemerkungen. Bei der Ausführung ist auf folgendes zu achten: Ein Umschwenken der Flüssigkeiten ist zu vermeiden, bevor man bis zur Marke aufgefüllt hat, weil sonst Schaumbildung eintritt, die ein genaues Einstellen verhindert. Es ist auch gar nicht nötig, die Eisenhydroxydlösung tropfenweise unter starkem Umschütteln hinzuzugeben, sondern man läßt sie gleich der Magnesiumsulfatlösung längs der Wand des Kölbchens vorsichtig herabfließen. — Verwendet man mehr als 10 g Blut, so ist auch die Menge des Liquor Ferri oxydati dialysati zu erhöhen. Man wird in der Regel an Eisenhydroydlösung das 5fache des Blutes zu nehmen haben. Ein Überschuß ist ohne Nachteil. Da der Chlorgehalt der Eisenlösung sich nicht ändert, so genügt eine mit 50 ccm vorgenommene

Doppelbestimmung. Natürlich muß die Eisenlösung sehr genau gemessen werden. — Bei der Titration nach Mohr ist die Endreaktion angezeigt, sobald die milchig-gelbe Lösung in eine gelbbraune umschlägt. Wollte man bis zur Rotfärbung titrieren, — wie in vielen Lehrbüchern angegeben —, so würde das Resultat zu hoch ausfallen, was an einer reinen Kochsalzlösung leicht ausprobiert werden kann. — Wird das Blut nicht direkt in dem zur weiteren Verarbeitung angewandten Kolben aufgefangen, will man es in einem anderen Gefäß flüssig halten, so ist hierzu Hirudin, das chlorfrei ist, zu verwenden, nicht aber das sonst gebräuchliche Kalium oxalicum neutrale, das meist Chlor enthält, außerdem mit der Silberlösung unter Bildung von oxalsaurem Silber in Reaktion tritt. — Schließlich sei noch bemerkt, daß bei Kontrollprüfungen auf absolute Chlorfreiheit der Materialien sorgfältig zu prüfen ist. Wir benutzten bei der Veraschung des Blutes nur Natrium carbonic. purissim. pro analysi, da es sich zeigte, daß z. B. Kaliumnatriumcarbonat verschiedener Firmen chlorhaltig war. Auch die Firma C. A. F. Kahlbaum schrieb uns, sie führe davon nur eine Qualität, die nicht ganz frei von Chlor sei, wenn sie auch nur Spuren enthalten würde.

Wir haben dann weiter gefunden, daß man die gleiche Methode auch zu einer Mikrobestimmung benutzen kann, wofür wir nachstehende Bedingungen festgestellt haben:

Man wiegt in ein tariertes 25-ccm-Kölbchen ca. 1 g Blut genau ab, gibt 5 ccm Eisenhydroxydlösung, 0,5 ccm 20%iger Magnesiumsulfatlösung hinzu und füllt bis zur Marke auf. Man verfährt dann entsprechend der Makromethode, nur mit dem Unterschied, daß man die Titration von genau 10 ccm des klaren Filtrates mit einer $^{n}/_{25}$-Silbernitratlösung und einer Bürette vornimmt, die in $^{1}/_{20}$ ccm eingeteilt ist. Auch der blinde Versuch ist unter gleichen Bedingungen auszuführen. In der Praxis kann zweckmäßig auch so verfahren werden, daß man in das Kölbchen zunächst etwa 15 ccm Wasser bringt und beides wiegt, darauf direkt aus dem Ohrläppchen oder der Fingerspitze 15 bis 20 Tropfen Blut einlaufen läßt, wieder wiegt und dann wie oben weiterarbeitet.

Zur Kontrolle dieser Methode verwendeten wir gleichfalls reine Kochsalzlösung. Wir fanden:

bei Anwendung einer $^{n}/_{10}$-$AgNO_3$-Lösung u. $^{1}/_{10}$-Bürette 0,496 NaCl
" " " $^{n}/_{25}$- " " $^{1}/_{20}$- " 0,498 "

Nach unserem neuen Mikroverfahren erhielten wir in derselben Lösung 0,499 % NaCl.

Versuche, die Titration mit $^n/_{50}$- oder mit $^n/_{100}$-Silbernitratlösung anzustellen, schlugen fehl, da in diesen Verdünnungen die Umschläge nicht genügend zu erkennen sind. Dagegen befriedigten die Resultate bei Anwendung einer $^n/_{25}$-Silbernitratlösung und einer $^1/_{20}$-ccm-Bürette. Die große Genauigkeit der Makromethode wird zwar nicht erreicht, aber das Verfahren dürfte für klinische Zwecke genügend genau ausfallen, sehr exaktes Arbeiten und geeichte Meßgeräte vorausgesetzt. Die Analysenbefunde dieser Mikromethode sind in folgender Tabelle niedergelegt.

Tabelle III.

Nr.	Blut von	Makromethode		Mikromethode	
		angewendete Blutmenge	Cl als %-NaCl berechnet	angewendete Blutmenge	Cl als %-NaCl berechnet
1	Pferd (Serum)	10 ccm	0,464	1 ccm	0,460
2	do.	10 „	0,464	1 „	0,460
3	do.	10 „	0,464	1 „	0,463
4	Kaninchen	8,326 g	0,557	0,959 g	0,551
5	do.	8,326 „	0,557	1,206 „	0,550
6	Hammel	9,812 „	0,553	1,005 „	0,549
7	do.	9,721 „	0,507	1,004 „	0,501
8	Mensch	9,343 „	0,450	0,961 „	0,445
9	Hammel	9,036 „	0,513	1,028 „	0,518
10	do.	9,481 „	0,512	1,027 „	0,508

Die größte Abweichung beträgt hiernach 1,2, die Durchschnittsdifferenz 0,69 %.

Auf die Wichtigkeit und die Vorzüge der Mikroverfahren hat erst kürzlich Ivar Bang im 49. Bd. dieser Zeitschr. S. 19 hingewiesen und dort auch ein „Verfahren zur Mikrobestimmung von Blutbestandteilen“ veröffentlicht.

Vor der Bangschen Methode hat unsere die größere Einfachheit voraus. Untersuchungen an normalem und anormalem Blut nach unserer Methode sind im Gange, wir werden über die Ergebnisse später berichten.

Herrn Krankenhausdirektor Dr. F. Volhard sprechen wir für den Hinweis auf dieses Thema und für die gütige Überlassung des Materials unseren Dank aus.

Zur Kritik der Lipoid- und der Ultrafiltertheorie der Plasmahaut nebst Beobachtungen über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloide für ihre Vitalaufnahme.

Von

W. Ruhland.

(Eingegangen am 22. Juni 1913.)

Im vorigen Jahre veröffentlichte ich zwei Abhandlungen[1]), in denen ich zeigte, daß es mir geglückt war, das die Aufnahme von Kolloiden in lebende Pflanzenzellen beherrschende Prinzip aufzufinden. Als Beispiele hatte ich, ihrer leichten Nachweisbarkeit in der Zelle wegen, zunächst Anilinfarbstoffe gewählt. Ich war auf Grund eines einfachen Versuches mit Gelatineplatten imstande, vorherzusagen, welche Farbstoffe in die Zelle aufnehmbar sind, welche nicht, und sogar, ob sie geschwind oder langsam eindringen. Dasselbe Prinzip erwies sich dann auch bei Versuchen mit anderen, und zwar zelleignen Kolloiden[2]), gefärbten wie ungefärbten, als durchgehends gültig, so daß bei der großen Zahl der untersuchten Beispiele für den unbefangenen Beurteiler kein Zweifel mehr an der Gesetzmäßigkeit der aufgefundenen Beziehungen obwalten konnte.

Zugleich aber ergaben diese wie frühere Versuche ein gewichtiges Beweismaterial gegen die Berechtigung der in der Pflanzenphysiologie zwar von jeher meist skeptisch beurteilten, in der Tierphysiologie aber noch heute, und vielleicht sogar mehr denn je, herrschenden Overtonschen Lipoidtheorie der Plasmahaut, welche die Grundlagen der Stoffwechselphysiologie, die diosmotischen Verhältnisse der Plasmahaut, erklären will.

---

[1]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **30**, 139, 1912; Jahrb. f. wiss. Botan. **51**, 376 bis 431, 1912.

[2]) W. Ruhland, Biolog. Centralbl. **33**, 1913.

Mein Beweismaterial einerseits für das von mir aufgedeckte Prinzip, andererseits gegen die Lipoidtheorie, ist in dieser Zeitschrift jüngst von Höber und einem seiner Mitarbeiter[1]) einer Kritik unterzogen worden, die m. E. nur zeigt, daß ein so einseitiges Anhängertum, wie es Höber von jeher der Overtonschen Theorie entgegengebracht hat, verhindert, neuen Tatsachen gerecht zu werden.

Wenn ich somit den Höberschen Ausführungen auch keine Bedeutung beizumessen vermag, so will ich doch hier auf sie eingehen, weil mir dies eine erwünschte Gelegenheit bietet vor einem mehr tierphysiologischen Forum den Stand der Dinge in aller Kürze zu beleuchten und vielleicht unbefangenere Nachprüfungen an tierischen Objekten seitens anderer Autoren anzuregen. Zum mindesten hoffe ich dadurch zu verhindern, daß in diesen Kreisen lediglich die die Sachlage voreingenommen beurteilende, wichtige Tatsachen unerwähnt lassende Darstellung Höbers bekannt wird.

Auf die Gründe der ganz besonderen Eignung von Pflanzenzellen für Permeabilitätsstudien brauche ich kaum einzugehen. Sie sind oft hervorgehoben worden und haben ja auch Overton selbst seinerzeit veranlaßt, ihnen bei Aufstellung der Grundlagen seiner Theorie vor tierischen den Vorzug zu geben. Ich erinnere deshalb nur im Vorbeigehen an die feste Zellhaut, die als Widerlage den Plasmakörper einschließt und die plasmolytischen Versuche so einfach macht, ferner ihre oft außerordentliche Größe und den Umstand, daß sie, ohne Schaden zu nehmen, aus dem Gewebeverbande durch Schnitte herausgelöst werden können, eine Sachlage, welche die führende Rolle der Pflanzenphysiologie auf diesem Gebiete ermöglicht hat.

I. Die Lipoidtheorie.

Die Lipoidtheorie hat bekanntlich ihre ursprüngliche extremste, von Overton herrührende Fassung, wonach die Plasmahaut durchweg aus Lipoiden bestehen sollte, schon seit mehreren Jahren aufgeben müssen. Denn die Annahme einer peripheren Öl-, Cholesterin- usw. Schicht war mit der leichten Wegsamkeit der Haut für Wasser unvereinbar. Ein Stoff wie Lecithin, der in Wasser quellbar ist, konnte gleichfalls nicht in

[1]) R. Höber und O. Nast, diese Zeitschr. 50, 418, 1913.

Frage kommen, da, wie von Nathansohn[1]) und mir[2]) gezeigt wurde, dann gleichermaßen wie für lipoidlösliche auch eine Wegsamkeit für nur wasser- und nicht lipoidlösliche Stoffe geschaffen wäre.

Nathansohn kam der so bedrängten Theorie zu Hilfe, indem er eine, nachträglich auch mehrfach von Höber[3]) gutgeheißene, kompliziertere Auswegskonstruktion ersann. Danach sollte die Plasmahaut aus einem Mosaik lebender „plasmatischer“ Anteile und solcher aus einem in Wasser nicht quellbaren Lipoid wie Cholesterin bestehen, so daß lipoidlösliche Stoffe durch die letzteren, allein gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten zwischen Lipoid und Wasser, durch die ersteren aber Wasser und, regulatorisch durch sie beeinflußt, ev. auch in ihm gelöste, lipoidunlösliche Stoffe passieren könnten.

Mit Hilfe der sehr genauen, von ihm gefundenen plasmolytischen Methode der Permeabilitätsfaktoren trat aber jüngst Lepeschkin[4]) auch dieser Hypothese entgegen. Wäre sie richtig, so müßten die so extrem lipoidlöslichen Anaesthetica Äther und Chloroform bei der Narkose gemäß ihrem Verteilungskoeffizienten sich nur in den Lipoidteilchen der Plasmahaut ansammeln, so daß dann z. B. Salpeter und Zucker, obwohl in Äther und Chloroform unlöslich, nicht langsamer als sonst durch die lebenden Hautteilchen diosmieren müßten. Das ausgesprochenste Gegenteil war aber tatsächlich der Fall, so daß eine allgemeine Verteilung der Narkotica in der Plasmahaut (oder wohl richtiger im ganzen Plasma) anzunehmen ist.

Man kann sich aber auf einem viel einfacheren, direkteren Wege davon überzeugen, daß freie Lipoide mit den ihnen zugeschriebenen Lösungsaffinitäten weder ausschließlich noch teilweise die Plasmahaut aufbauen. Denn wäre es der Fall, so müßte unbedingt beim Durchgang stark lipoidlöslicher Farbstoffe durch die Zelle eine Farbspeicherung, ähnlich wie von Alkanna in Fetten, stattfinden, die Haut müßte irgendeine Färbung annehmen. In Wahrheit bleibt sie, wie das ganze Plasma, gänzlich ungefärbt, und selbst in den relativ

[1]) Jahrb. f. wiss. Botan. 39, 1904; vgl. besonders S. 638 bis 644.
[2]) Ebendort 46, I, 1908; vgl. besonders S. 33 bis 36.
[3]) Physikal. Chemie der Zelle und Gewebe, 3. Aufl. 1913, S. 253f.
[4]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 349, 1912.

seltenen Fällen, wo gewisse Objekte im lebenden Plasma einzelne Farbstoffe, wie sonst nur in der Vakuole, speichern (auf Grund irgendwelcher Reaktionen mit unbekannten Inhaltsstoffen), hat die Haut nicht die mindeste tiefere Färbung als das übrige Plasma, wie an den oft sehr großen Zellen mikroskopisch und ultramikroskopisch mit Sicherheit festzustellen ist[1]).

Man kann daher solche Farbstoffe geradezu als Reagens dafür betrachten, daß Stoffe von den Löslichkeitsverhältnissen, wie Overton sie fordert, in der Plasmahaut fehlen. Damit ist aber das unbestreitbare allgemeine Vorhandensein von Lipoiden wie Lecithin, Cholesterin usw. im Plasma sehr wohl in Einklang zu bringen. Ich möchte mich der von Palladin und Lepeschkin[2]) geäußerten Auffassung anschließen, daß sie chemisch an Plasma, so lange es lebend ist, gebunden sind. Dadurch werden aber ganz andere Löslichkeitsverhältnisse bedingt sein.

Niemand hat bekanntlich bisher Lipoide in der Plasmahaut gesehen oder nachgewiesen, und alles, was bisher über sie geschrieben wurde, beruht lediglich auf indirekten „Schlüssen". Diese betreffen bekanntlich die Parallelität zwischen vitaler Aufnahmefähigkeit sowie -geschwindigkeit einerseits und der Lipoidlöslichkeit andererseits. Bezüglich der letzteren liegen freilich bisher nur für die kleine Zahl von Anaestheticis und für einige Glieder homologer Reihen genauere Messungen vor. Und von dem vitalen Verhalten gerade dieser selben Stoffe behauptet bekanntlich J. Traube, daß ihm eine ganz andere Eigenschaft derselben, die Oberflächenaktivität, der „Haftdruck", parallel geht und gemäß seiner Diosmosetheorie das ausschlaggebende Moment darstellt.

Es erhellt aus diesem Sachverhalt für jeden Unbefangenen, daß die aus den Parallelerscheinungen nach so verschiedenen Richtungen hin gezogenen kausalen Folgerungen einer besonders strengen kritischen Prüfung bedürfen, und die mit einer so einfachen und deshalb bestechenden Formel arbeitende Theorie aufzugeben ist, wenn es sich zeigt, daß sie der Mannigfaltigkeit des vitalen Geschehens nicht gerecht wird.

---

[1]) Näheres vgl. z. B. für die Gallocyaninverbindung Prunepure in meiner Arbeit, Jahrb. f. wiss. Bot. **1912**, S. 425f.

[2]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **30**, 528, 1912.

In keiner Weise mit der Lipoidtheorie in Einklang zu bringende, schroffe Widersprüche ergaben sich mir nun gerade bei einer näheren Prüfung des diosmotischen Verhaltens von Pflanzenzellen gegenüber Anilinfarbstoffen, in dem seinerzeit Overton und seine Anhänger die stärkste Stütze ihrer Lehre erblickt hatten. Diese Tatsachen sollen gegenüber den älteren und jüngsten Einwürfen und Nichterwähnungen Höbers nun zunächst nochmals kurz zusammengefaßt und beleuchtet werden.

Die Feststellung Overtons ging bekanntlich kurz dahin, daß die stark lipoidlöslichen basischen Farbstoffe leicht aufgenommen und gespeichert werden, während dies bei den schwer oder nicht lipoidlöslichen sauren Farbstoffen nicht der Fall war.

1. Basische Farbstoffe. Zunächst möge das Wesentlichste der von mir gefundenen Widersprüche tabellarisch zusammengestellt werden. Es bedeuten die Zeichen: +++ sehr leicht, ++ etwas weniger, + wenig lipoidlöslich; die Löslichkeit wurde in sehr starken Lösungen reinen Cholesterins untersucht. wobei für dieses ein Lösungsmittel gewählt werden muß, in dem die Farbstoffe nicht schon an und für sich löslich sind. Unter „Permeabilität" bedeuten die Zeichen: 0 nicht, + schwer und langsam, ++ schneller, +++ sehr rasch (fast augenblicklich) permeierend.

Farbstoff	Lösungsmittel des Cholesterins	Lipoid-löslichkeit	Permea-bilität
1. Methylgrünkrystalle I	Terpentinöl	Unlöslich	+++
2. Methylengrün . . .	"	"	+++
3. Thionin	"	"	+++
4. Neublau R	Terpentinöl u. Xylol	"	++
5. Azophosphin GO . .	Terpentinöl	"	+++
6. Malachitgrün	"	"	+++
7. Bismarckbraun . . .	Xylol	"	+++
8. Viktoriablau 4 R . .	Terpentinöl	+++	0
" B . . .	"	+++	0
9. Nachtblau	"	+++	0
10. Baslerblau BB . . .	"	+++[1])	0
11. " R	Xylol	++(+)	0
12. Rhodamin G	Terpentinöl	+++[1])	+
13. Diazingrün	"	+++	+
14. Viktoriablau R . . .	"	+++	+

[1]) Auch in Fetten (Wallrat, Lanolin, Olivenöl usw.) leicht löslich.

Dazu sind folgende Bemerkungen nötig: Neublau R ist nicht, wie Höber behauptet, lipoidlöslich. Selbst in einer siedenden gesättigten Cholesterin-Xylol-Lösung ist es vielmehr völlig unlöslich. Malachitgrün ist zwar, wie viele andere Anilinfarbstoffe, giftig, in entsprechend schwachen Lösungen verhält es sich dagegen genau wie Methylenblau, Neutralrot usw. Bismarckbraun ist in der Siedehitze leider in allen geprüften Lösungsmitteln des Cholesterins etwas löslich, doch wird durch das Hinzukommen von Cholesterin und andauerndes Sieden die Lösung nicht oder kaum merklich verstärkt. Bei Zimmertemperatur ist es in Xylol unlöslich. Hier kann man sich bei Zugabe von Cholesterin am leichtesten von der Lipoidunlöslichkeit überzeugen.

In der Tabelle folgen nun 5 basische Farbstoffe, die trotz leichter Lipoidlöslichkeit nicht eindringen. Da sie mit Gerbstoffen unlösliche Tannate bilden, so bieten Zellen mit gerbstoffhaltigen Vakuolen völlige Gewißheit für das Nichteindringen. Sie bilden alle schon bei kurzem Schütteln in der Kälte tiefblau gefärbte Lösungen in Wasser, sind also durchaus nicht schwer löslich, wie Höber das darstellt. Übrigens würde das für ihr vitales Verhalten nicht die mindeste Rolle spielen, wie die hochverdünnten Lösungen permeierender Farbstoffe und z. B. das vielleicht ein wenig schwerer lösliche, aber gerade doch permeierende Viktoriablau R zeigen.

Höber weist nun auf die mit der schon von mir hervorgehobenen hohen Kolloidität dieser Farbstoffe in Einklang stehende Empfindlichkeit derselben gegen Elektrolyte hin und hält für möglich, daß die Farbstoffe, schon „bevor sie die Plasmahaut erreicht haben, ganz oder fast ganz ausgefallen sind“, und daß speziell die Cellulosehaut „dem Vordringen der kolloiden Farbbase durch Ausfällung ein Ziel setzt“, obwohl ich diesem Einwand bereits (a. a. O. S 398f.) zuvorgekommen war. Ich konnte erneut feststellen, daß unversehrte Spirogyren, Epidermiszellen der Zwiebelschuppen von Allium cepa usw. nach Tötung mit Chloroform, durch Hitze usw. tiefe schöne Kernfärbungen, zum Teil sogar (z. B. mit Baslerblau R, Viktoriablau R und B) schon nach kürzester Frist, zeigen. Beim Baslerblau BB verzögert sich die Kernfärbung durch die Zellhautfärbung ein wenig, ist aber auch hier unzweifelhaft und

gegebenenfalls nach teilweiser Verdrängung des Farbstoffs aus der Membran durch Zusatz von Kalisalpeter u. dgl. zu erkennen.

Es gibt also 7 basische Farbstoffe, die, obwohl ganz lipoidunlöslich, mit großer Geschwindigkeit in Pflanzenzellen aufgenommen werden, und 5 weitere basische Farbstoffe, die, obwohl leicht lipoidlöslich, vor der angeblich „lipoiden" Plasmahaut eine undurchschreitbare Schranke finden. 3 weitere basische Farbstoffe, die ebenfalls sehr leicht lipoidlöslich sind und die Cellulosemembran schnell durchdringen, vermögen die Plasmahaut nur schwer und langsam zu passieren.

2. Saure Farbstoffe. Nicht genug mit diesen schweren Widersprüchen zur Lipoidtheorie, ist auch das Verhalten der sauren Farbstoffe in keiner Weise mit derselben in Einklang zu bringen.

Farbstoff	Lösungsmittel des Cholesterins	Lipoid-löslichkeit	Permeabilität
1. Erythrosin B . . .	Benzol	+++[1]	0(+)
2. Cyanosin	Benzol u. Terpentin	+++[1]	0
3. Rose bengale . . .	Terpentin	++	0(+)
4. Echtrot A	Benzol	+++[1]	0
5. Tuchrot 3 GA . .	„	+++[1]	0
6. Oxaminmarron . .	„	++	0
7. Gallein	„	++	0
8. Gallaminblau . . .	Xylol	++	0

Das wären also 6 Farbstoffe, die, obwohl leicht lipoidlöslich, nicht in lebende Zellen aufgenommen werden Die ersten 4 dringen momentan durch die Cellulosehaut und färben Plasma und Kern toter Zellen, bei den übrigen dauert es ein wenig länger; sie alle machen also auch erst vor der „lipoiden" Plasmahaut Halt. Erythrosin B zeigt eine sehr geringe, Rose bengale eine äußerst geringe Durchtrittsfähigkeit durch dieselbe.

Wie steht es nun mit der großen Schar der übrigen bisher untersuchten, lipoidunlöslichen sauren Farbstoffe? Eine große Zahl — ich fand deren nicht weniger als 36 — werden mit verschiedener Geschwindigkeit, zum Teil schnell, zum Teil langsamer, intravital gespeichert, und zwar nahezu von allen daraufhin untersuchten höheren

[1]) Auch in echten Fetten löslich.

Pflanzen! Es sind dies: Cyanol, Erioglaucin A, Lichtgrün FS, Säuregrün, Patentblau V und A, Orange G, Naphtholgrün B, Rotviolett 4 RS und 5 RS, Rosindulin 2 B, Dinitroanthrachrysondisulfosäure, Rosindulin 2 G, Echtsulfonviolett, Naphtholgelb S, Eriocyanin A, Palatinscharlach, Chinolingelb, Brillantcrocein 3 B, Palatinrot A, Methylorange, Azorubin, Bordeaux S, Rubin S, Naphtholblauschwarz, Nachtgrün 2 B, Echtbraun O, NT und gelblich, Bilbricher Scharlach, Guineagrün B, Heliotrop 2 B, Säureviolett 6 B, Phloxin B und Eosin.

Dieses der Lipoidtheorie schroff widersprechende Verhalten der Säurefarbstoffe kann Höber durch allerlei gekünstelte Gedankengänge nicht aus der Welt schaffen. Der Kernpunkt dieser Argumentation ist (S. 429 a. a. O.) folgender: „Während man eigentlich wahllos mit jeder basischen Farbe jede Zelle vital färben kann, gelingt dies ... mit den ... Säurefarbstoffen nur unter bestimmten Verhältnissen oder an bestimmten Orten.“ Mit dieser Bemerkung ist auf eine bekannte, von ihm der Lipoidtheorie zuliebe aufgestellte Hilfstheorie angespielt, mit der die unbequeme Tatsache, daß eine große Zahl lipoidunlöslicher Stoffe in die Zelle aufgenommen wird, „erklärt“ werden soll. Diese sollen nämlich nicht durch „einfache Diosmose“ in die Zelle eindringen, sondern durch „einen anderen und komplizierteren“ Vorgang, was als „physiologische“ Permeabilität im Gegensatz zu der „physikalischen“ lipoidlöslicher Stoffe bezeichnet wird. Ich habe mich über diese, auch von anderer Seite mit Recht „irreführend“ genannte[1]) Unterscheidung schon früher genügend ausgesprochen. Hier deshalb nur einige die Säurefarbstoffe betreffende Worte.

Zunächst ist der Satz, daß „basische Farbstoffe jede Zelle vital färben“, wie schon oben gezeigt, unrichtig. Selbst solche, die in zahlreichen verschiedenen Zellen gespeichert werden, wie Azophosphin, Anilingelb, Chrysoidin R usw., sind in vielen andern Zellen und andern Objekten, denen sie dargeboten wurden, nicht nachweisbar. In diesen Fällen machen wir die an Gewißheit grenzende Annahme, daß sie wohl eindrangen,

[1]) E. Küster, Jahrb. f. wiss. Botan. 50, 261, 1911; vgl. auch die auf Tierversuchen beruhende Ablehnung von Garmus, Zeitschr. f. Biol. 58, 185, 1912; ferner W. Schulemann, Arch. f. Pharmakol. 250, 252, 1912.

aber nur optisch nicht kenntlich wurden, da in der Zelle reagierfähige Stoffe oder die Bedingungen zu einer die Speicherung ermöglichenden Reaktion fehlten.

Nur Voreingenommenheit für die Lipoidtheorie, aber keine sachlichen Gründe können hindern, diesen Schluß auch für die Säurefarbstoffe zu machen. Ja, man könnte sogar sagen, daß dieser Schluß hier insofern noch in höherem Maße berechtigt ist, als die Säurefarbstoffe, mindestens die leichter permeierenden, noch allgemeiner aufgenommen werden; wenigstens habe ich bisher noch keine pflanzlichen Objekte ausfindig machen können, in denen Cyanol, Erioglaucin, Lichtgrün, Palatinrot usw. nicht gespeichert werden, wenn eine genügende Transpirationsfläche und entsprechend weite, sich nicht verstopfende Gefäßbahnen da sind.

Höber legt einem Versuch Küsters großen Wert bei, der Internodien von Tropaeolum mehrere Tage in $2\,^0/_{00}$igem Säurefuchsin eingelegt hatte, und darauf die an die Leitbündel anstoßenden Parenchymzellen „sehr kräftig vital gefärbt" fand. Daß die übrigen Zellen nicht gefärbt waren, steht nicht da, scheint von Höber aber angenommen und im Sinne seiner „physiologischen" Permeabilität gedeutet zu werden. Nun erklärt es sich sehr einfach, daß gerade die erwähnten Zellen kräftig gefärbt waren, für jeden etwas Unterrichteten dadurch, daß der Farbstoff an die übrigen Zellen infolge der sehr schweren Durchlässigkeit der Cuticula (Cutinisierung der äußeren Zellmembran der Epidermiszellen) nicht heran konnte. Trennt man diese aber vorher ab, so färben sich auch die andern Zellen, und zwar ganz natürlich die äußeren Parenchymzellen am besten (den Versuch führte ich nicht mit einer $2\,^0/_{00}$igen Lösung, in der die Objekte schon nach mehreren Stunden abgestorben waren, sondern mit einer mindestens um das 10fache verdünnteren Lösung aus).

C. Andere Stoffe. Bekanntlich gibt es auch außer den obenerwähnten eine große Zahl anderer lipoidunlöslicher Stoffe, die durch die Plasmahaut von Planzenzellen eindringen. Es soll hier aber nur von denjenigen und auch nur in aller Kürze die Rede sein, die dies mit großer Geschwindigkeit tun. Hierher gehören, wie Pfeffer[1]) schon im Jahre 1877 fand und

[1]) Osmotische Untersuchungen usw., S. 135.

auch ich beobachtete, die starken Mineralsäuren. Auch die starken Alkalihydrate fand ich[1]) schnell eindringend. Da beides für Tierzellen, soweit geprüft[2]), anscheinend nicht gilt, so liegt hier offenbar eine Verschiedenheit in den „statischen“ Eigenschaften der Plasmahaut vor; solche Möglichkeiten sind aber auch sonst sehr im Auge zu behalten und von großer Bedeutung.

Ich will nur noch darauf hinweisen, daß, wie Alfred Fischer[3]) gezeigt hat, eine ganze Gruppe von Bakterien diosmotisch dadurch gekennzeichnet ist, daß anorganische Salze augenblicklich in die Zellen eindringen, also ohne auch nur anfängliche Plasmolyse in selbst stark hypertonischen Lösungen hervorzurufen.

In Hefezellen wird die lipoidunlösliche Lactose sehr geschwind, dagegen, was noch wichtiger ist, das so stark lipoidlösliche Chloralhydat nicht aufgenommen. Man kann, wie Swellengrebel[4]) fand, mit diesem Stoff dauernde Plasmolyse erzeugen und er wirkt dementsprechend auch nicht narkotisierend.

In dieselben Hefezellen dringen aber die lipoidlöslichen Anaesthetica, Chloroform und Äther momentan ein und wirken dementsprechend. Welche Hilfshypothesen müßte Höber wohl erfinden, um einen solchen Sachverhalt mit der „Lipoidlehre“ in Einklang zu bringen! Und dabei stehen wir erst in den Anfängen der Erforschung der diosmotischen Eigenschaften der verschiedenen Organismengruppen, so daß weitere mit der Overtonschen Lehre unvereinbare Widersprüche wohl mit Sicherheit zu erwarten sind.

II. Die Plasmahaut als Ultrafilter.

Ich habe dann gefunden und an Versuchen mit 30 basischen und 89 sauren Farbstoffen näher auseinandergesetzt, daß die Aufnahmefähigkeit der lebenden Zelle durch die

---

[1]) a. a. O. 1912, S. 430.

[2]) Overton, Arch. f. d. ges. Physiol. **92**, 115, 1902. — Bethe, ebenda **127**, 219, 1909. — Warburg, Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 305, 1910; diese Zeitschr. **29**, 414, 1910.

[3]) Jahrb. f. wiss. Botan. **27**, 1, 1895.

[4]) Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **14**, 374, 1905.

räumlichen Verhältnisse der Teilchen der Farbsole und der Poren des Plasmahautgels bestimmt wird. Diese wirkt somit als Ultrafilter, das, wie jedes Ultrafilter, Sole unterhalb eines bestimmten Dispersionsgrades nicht mehr passieren läßt.

Diese einfache Lösung des vielumstrittenen Problems kann als eine ganz sichere und einwandfreie bezeichnet werden. Die relative Teilchengröße (Dispersionsgrad, spezifische Oberfläche) kann man, wie ich im Einklang mit den Regeln der allgemeinen Kolloidanalyse fand, am eindeutigsten durch Diffusionsversuche in Gelen feststellen, die natürlich keine mit den Solen chemisch reagierenden Stoffe enthalten dürfen. Am besten eignet sich im vorliegenden Falle ein etwa 20%iges Gelatinegel.

Daß die gefundene Lösung die richtige war, ergab sich aus der durchgehenden Übereinstimmung der Gel- und der vitalen Versuche. Ich war auf Grund eines solchen Gelversuches, wie erwähnt, in der Lage, voraussagen zu können, ob ein bestimmter Farbstoff von lebenden Pflanzenzellen aufnehmbar sein würde oder nicht, und im ersteren Falle, ob er schnell oder langsam passieren werde. Das ist gewiß alles, was man verlangen kann. Auch der Umstand, daß nach den Resultaten der Kolloidchemie vom Zusammenhang der Kolloidität der Sole und der erwähnten Gelbeschaffenheit eine derartige Lösung unserer biologischen Frage nahezu als etwas Selbstverständliches anmuten muß, ist wohl geeignet, das Vertrauen zu erhöhen.

Es ist denn auch schon längst von Pfeffer und anderen die Vermutung ausgesprochen worden, daß die Kolloidität beim Passieren der Plasmahaut eine Rolle spielen müsse. Höber selbst hatte gefunden, daß die relativ wenigen, nicht in Tierzellen aufnehmbaren sauren Farbstoffe gröbere Suspensoide seien. Wenn ich mich gerade hiervon früher nicht gleich überzeugen konnte, wie Höber so geflissentlich hervorhebt, so geschah dies, wie ich bereits a. a. O. S. 387 und 412 betont hatte, weil ich damals die Sole mit dem Spiegelkondensor nur optisch untersucht hatte, was mir damals als die sicherste Methode erschien, die aber bei der verschiedenen Teilchengröße eines und desselben Sols notwendig zu Irrtümern führen mußte.

Auch die Küsterschen Untersuchungen, deren wichtigstes Resultat war, daß eine viel größere Zahl saurer Farbstoffe in die Pflanzenzelle aufgenommen wird, als Pfeffer und ich gefunden hatten, ließen erkennen, daß diese meist zu den durch Pergamenthülsen leichter diffundierenden gehörten.

Ich habe aber in meiner Arbeit S. 392 bis 394 und S. 410 bis 415 ausführlich dargetan, daß weder die Hydrodiffusion durch Pergament- usw. Hülsen, noch die Elektrolytfällbarkeit, auch nicht die Größe der Moleküle und ihr Gehalt an Benzolkernen oder chemische Besonderheiten und solche der Löslichkeit, sondern eben lediglich die durch die Geldiffusion definierte Größe der Teilchen das ausschlaggebende, und zwar allein entscheidende Moment sind.

Greifen wir z. B. die Pyroninfarbstoffe heraus, deren wichtigste Eigenschaften in der folgenden Tabelle zusammengefaßt sind.

Farbstoff	Chemischer Charakter	Elektrische Ladung gegen Wasser	Lipoid-löslichkeit	Hydro-diffusion	Elektrolyt-fällbarkeit	Geldiffusion	Permeabilität
Rhodamin G . . .	basisch	positiv	+++	+++	(+)	+	+
Erythrosin B . .	sauer	negativ	+++	++(+)	++	(+)	(+)
Phloxin B	"	"	0	+	++	+	+
Rose bengale . .	"	"	++	+++	++	(+)	(+)
Eosin	"	"	0	+	++	+	+
Cyanosin spritl. .	"	"	+++	++(+)	++	0	0
Gallein	"	"	++	+	+++	0	0

Es war auch nach den obenerwähnten Pflanzen-Versuchen die Hauptsache noch ganz unentschieden und ununtersucht, ob denn wirklich erst die Plasmahaut der Pflanzenzellen den nicht permeierenden Säurefarbstoffen den Eintritt verwehrt, und ein auf diesem Gebiet sonst so ausgezeichneter und erfahrener Beobachter wie Lepeschkin[1]) hatte ausdrücklich die Cellulosehäute dafür verantwortlich gemacht, so daß dann natürlich derartige Versuche für die Erkenntnis der Plasmahaut gar nichts besagen würden. Durch Versuche mit getöteten

[1]) Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 29, 250f., 1911.

und durch Zucker oder Salze plasmolysierten lebenden Zellen habe ich dann gezeigt, daß ohne alle Frage eben gerade die Plasmahaut die Schranke für die fraglichen weniger dispersen Stoffe darstellt.

III. Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloide.

Neben den in den letzten beiden Absätzen erwähnten Punkten ist dann vor allem noch der für meine Ultrafilterlehre wichtig, daß sich ihr gleichermaßen basische wie saure, also positiv wie negativ geladene Farbstoffe fügen.

Da alle Farbstoffe, wie gesagt, erst durch Speicherung in der Zelle für das Auge unmittelbar sichtbar werden, so versteht es sich ganz von selbst, welche Rolle die Art der Speicherung für die Geschwindigkeit des Sichtbarwerdens spielt. Wir dürfen deshalb hinsichtlich der Einteilung in schnell, langsam usw. permeierende Farbstoffe natürlich nur solche miteinander vergleichen, die auf die analoge Art und Weise gespeichert werden.

Wenn wir daher beobachten, daß die dargebotenen Säurefarbstoffe bei gleicher Beweglichkeit in Gelen fast stets bedeutend langsamer als basische in der Zelle sichtbar werden, so wird die naheliegende Vermutung sein, daß die Ursache eben in dem besonderen Speicherungsvorgang liegt, der infolge der chemischen Verschiedenheit beider Kategorien ja selbstverständlich ein andersartiger sein muß. Ich habe darauf hingewiesen, daß die basischen Farbstoffe durch hochmolekulare Säuren des Zellsaftes, wie Gerbsäure, salzartig, also durch eine schnell verlaufende Ionenreaktion gebunden werden, wodurch das für den raschen Nachstrom von neuem Farbstoff nötige osmotische Gefälle aufrechterhalten wird, und die Vermutung ausgesprochen, daß die Säurefarbstoffe in den meist deutlich sauren Zellsäften durch eine langsam von statten gehende Kolloidreaktion in eine minder disperse, nicht permeierende Form überführt werden. Ich habe, was Höber unerwähnt läßt, auf S. 385 f. meiner Arbeit einige Wahrscheinlichkeitsargumente für meine Auffassung beigebracht, die ich hier nicht wiederholen will. Beweise waren es freilich nicht und konnten es infolge unserer Unkenntnis der betreffenden intracellularen Vorgänge nicht sein.

Es ist aber klar, daß dieser Punkt, den Höber wieder sehr betonen zu müssen glaubt, für die Auffassung der Plasmahaut als Ultrafilter ganz gleichgültig ist. Denn selbst wenn, wie Höber wiederholt vermutet, die elektronegative Ladung (wohl weil sein Vertrauen zur Lipoidunlöslichkeit trotz gegenteiliger Versicherung nicht mehr allzu groß ist) für das schwere Eindringen der Säurefarbstoffe verantwortlich zu machen wäre, so würde das eben nur das „Tempo“ berühren, ein lediglich retardierendes Moment sein, das bald überwunden wird und das Wirken des Hauptfaktors, der Dispersität, klar zutage treten läßt.

Mir war es von vornherein sehr unwahrscheinlich, daß der elektrischen Ladung hier eine nennenswerte Bedeutung zukommen sollte, u. a. deshalb, weil in Gelatine, die wie suspendierte lebende Zellen (und nach Höber demnach wie die Kolloide der Plasmahaut) im elektrischen Strom anodische Konvektion zeigt, die Ausbreitung der positiv geladenen basischen und der negativen Säurefarbstoffe gleich gut erfolgt.

Ich bin inzwischen nun in der Lage, den zwingenden Beweis für die Richtigkeit meiner Schlüsse zu erbringen, und darzutun, daß wirklich der Durchtritt der elektronegativen, meist lipoidunlöslichen Säurefarbstoffe durch die Plasmahaut mit der gleichen Geschwindigkeit wie der der positiven, meist lipoidlöslichen gleich dispersen basischen Farbstoffe erfolgt, und die Verzögerung ihres Sichtbarwerdens bei der bisherigen Versuchsanstellung in der Tat lediglich sekundär auf der Speicherungsart beruhte.

Wenn man kleine Gewebestücke von nicht zu kleinen, lebenden, ungefärbten Parenchymzellen oder Schnitte durch solche in etwa 1 bis $3\,^0/_{00}$ige, also tiefgefärbte Lösungen der höher dispersen Säurefarbstoffe überträgt, also ganz wie man es mit basischen Farbstoffen zu tun pflegte, so ist der Farbstoff (z. B. Erioglaucin, Cyanol, Säurefuchsin, Lichtgrün usw.) schon nach wenigen Minnten (bei den weniger dispersen dauert es entsprechend länger) bis nahe zum Konzentrationsgleichgewicht mit der Außenlösung in diejenigen Zellen eingedrungen, zu denen er unbehindert (z. B. durch die Luft der Intercellularräume) hinzutreten konnte. Er ist aber — und das ist der springende Punkt, weswegen die

Feststellung dieser wichtigen Tatsache bisher nicht gelungen war — noch nicht „gespeichert“, d. h. durch irgendeine Reaktion mit Zellinhaltsbestandteilen indiffusibel geworden.

Man muß deshalb den Schnitt direkt aus der Farblösung oder jedenfalls nur nach sehr flüchtigem Abspülen rasch in eine sehr stark hypertonische Zucker- oder Salzlösung übertragen, und kann dann unter dem Mikroskop in den durch Plasmolyse stark verkleinerten und konzentrierten Vakuolen günstig gelegenen Zellen eine tiefrote bzw. blaue Färbung wahrnehmen.

Alsbald beginnt diese aber zu verblassen, da der Farbstoff mit derselben Geschwindigkeit, mit der er eingedrungen ist, aus der Zelle auch wieder exosmiert. Im Gegensatz dazu halten bekanntlich Pflanzenzellen, die Säurefarbstoffe mit Hilfe der Transpirationssaugung gespeichert haben, diese so fest, daß selbst bei tagelangem Verweilen in Wasser keine Entfärbung wahrzunehmen ist.

Für diesen fundamental wichtigen Versuch[1]) eignen sich alle bisher von mir geprüften farblosen, nicht zu kleinen (wegen der Plasmolyse!) Zellen mit großen Vakuolen.

IV. Die „physiologische“ Permeabilität und die Tierversuche.

Die Auffassung Höbers (a. a. O. S. 429), daß nur gleichsam ausnahmsweise ein Säurefarbstoff eindringt, wurde oben schon zurückgewiesen; das Gegenteil ist der Fall, natürlich müssen — wie für basische — stets die Speicherungsbedingungen im Innern geboten sein.

Die Ursache, daß man früher von der allgemeinen Aufnahmefähigkeit der Pflanzenzellen für Säurefarbstoffe nichts wußte, ist eine sehr einfache. Die Speicherung, auch der schnell permeierenden, erfolgt so langsam, daß die Objekte meistens in den mehr oder weniger giftigen Lösungen schon absterben, bevor der Farbstoff für das Auge unmittelbar sichtbar wird. Nur mit

---

[1]) Näheres vgl. Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 31, 304, 1913. Tritt z. B. in einer 5 bis 10 Minuten in $1\,^{0}/_{00}$ Cyanol verbliebenen Zelle bei nachfolgender Plasmolyse Verkürzung des Radiums auf $^{1}/_{3}$ und somit Einengung der Vakuole auf $^{1}/_{27}$ ein, so kann in ihr trotz sofortiger Exosmose bei schnellem Arbeiten noch die Färbungsstärke einer 1 bis $2\,^{0}/_{0}$igen Lösung erkannt werden. A. a. O. S. 308 lies 27 statt 9.

dem wenig giftigen Tropäolin vermochte Pfeffer, mit dem ebenfalls relativ unschädlichen Säurefuchsin und Palatinscharlach ich Speicherungen bei gewissen widerstandsfähigen Objekten zu erhalten. Läßt man dagegen die Farblösungen durch die sehr hohen, bei der Transpiration frei werdenden osmotischen Kräfte ansaugen, so erhält man oft in wenigen Stunden Speicherungen. Goppelsroeder[1]) hat als erster bei seinen Versuchen transpirierende Sprossen mit der unteren Schnittfläche in Farblösungen tauchen lassen, und Küster[2]) wies an ebenso behandelten Objekten zuerst mikroskopisch nach, daß die Farbstoffe wirklich in die Zellen eingedrungen waren. Demgemäß erscheint auch an verletzten Stellen, die am lebhaftesten transpirieren, die Färbung zuerst und ein Objekt, bei dem in feuchter Atmosphäre nachweisbar die Transpiration minimal oder gleich Null geworden ist, nimmt keinen Farbstoff auf. Man kann aber, wie ich zeigte, auch an einem im Wasser liegenden Objekt die Färbung beschleunigen, wenn man es ab und zu herausnimmt und vorsichtig welken läßt.

Diesen einfachen Sachverhalt hat Höber zur Rettung der Lipoidtheorie und seiner Theorie von der „physiologischen" Permeabilität mit m. E. herbeigesuchten Schwierigkeiten und vor allem an der Hand von gewissen Erfahrungen bei tierischen Objekten zu komplizieren versucht. Natürlich werden die Bedingungen der Speicherung in tierischen Zellen ganz andersartige sein. Wenn aber bei Verfütterung von Farbstoffen das Darmepithel ungefärbt bleibt, gewisse Nierenepithelien aber sich tief färben, so zeigt dies Verhalten doch, daß das erstere genau wie diese permeabel für den Farbstoff ist, aber ihn nur nicht zu speichern vermag. Dies aber ist natürlich eine rein sekundäre, von den jedesmaligen chemischen Besonderheiten der Vakuolen bzw. des lebenden Zellinnern abhängige Spezialfrage, die zum Thema gar nichts beweist; im Gegenteil, offenbar liegen die Verhältnisse bei tierischen Zellen genau ebenso wie bei pflanzlichen, d. h. die disperseren Säurefarbstoffe werden ebenso allgemein aufgenommen wie die basischen. Während jene aber in Pflanzenzellen, wie es scheint, allgemein speicherbar sind, gilt dies nur für bestimmte Tierzellen.

[1]) Zeitschr. f. Chem. u. Ind. d. Kolloide 6, 111, 1910.
[2]) Jahrb. f. wiss. Bot. 50, 261, 1911.

Was Höbers neue Tierversuche mit basischen Farbstoffen betrifft, so erscheint es nach dem bisher Gesagten fast überflüssig, noch hervorzuheben, daß auch sie nicht das mindeste gegen die Ultrafilterlehre beweisen. Höber findet, daß die Farbstoffe Baslerblau R und BB, ferner Viktoriablau B und 4 R sowie Nachtblau, von denen ich gezeigt hatte, daß sie in Pflanzenzellen infolge der erheblichen Teilchengröße ihrer Sole nicht eindringen, von manchen Tierzellen gespeichert werden, aber, was eben das Wichtigste ist, dann erheblich viel schwieriger als andere Basen. Das aber stimmt vollkommen zu dem, was ich bereits aus den Versuchen mit Säurefarbstoffen in meiner Arbeit (S. 429) gefolgert hatte: daß die Porenweite der tierischen Plasmahäute, soweit bisher bekannt, eine größere sein muß, und diese infolgedessen auch noch Sole von geringerer Dispersion als Pflanzenzellen passieren lassen. Der Einfluß der Teilchengröße tritt nun in den Höberschen Versuchen, genau wie bei meinen eigenen, die sich auf nahe an der Grenze der Aufnehmbarkeit stehende Sole bezogen, klar in dem erheblich erschwerten Import zutage. Die leichtere Fällbarkeit dieser Stoffe durch Elektrolyte kann im Höberschem Sinne ebensowenig etwas beweisen als bei den hochkolloiden Sulfosäuren, aus deren Verhalten Höber selbst ja unbedenklich auf den Einfluß der Kolloidität mit Recht geschlossen hatte.

V. Schlußbemerkungen.

Wir sehen also, daß Höber keinen stichhaltigen Einwand gegen meine Ultrafilterlehre beizubringen vermocht hat. Diese findet übrigens, wie ich neuerdings[1]) gezeigt habe, auch an Versuchen mit zelleigenen Kolloiden ihre Bestätigung. So werden von Pflanzenzellen die im Gelatinegel unbeweglichen Hydrophilkolloide Gerbstoff, Inulin usw. nicht, das leicht bewegliche Saponin und die geldiffusiblen Enzyme, wie Diastase (Sekretions- sowie Translokationsdiastase), Invertase, Rhamnase, Oxydase aus Grasblättern usw. dagegen aufgenommen, Tatsachen, aus denen sich, wie ich a. a. O. zeigte, wichtige Schlüsse hinsichtlich der chemischen Zellorganisation ergeben.

[1]) Biolog. Centralbl. **33**, 1913.

Für den Ausbau der Ultrafiltertheorie der Plasmahaut auf tierphysiologischem Gebiet wird es zunächst wichtig sein, ein der größeren Kolloiddurchlässigkeit der Tierzellen entsprechendes weitporiges Gel herzustellen, wie ich es in dem etwa 20 $^0/_0$igen Gelatinegel für Parallelversuche an Pflanzenzellen gefunden habe. Das kann keine Schwierigkeiten machen, da ja, wie Bechhold zeigte, die Porenweite mit steigendem Wassergehalt wächst. Vielleicht wären hier Agargele vorzuziehen.

Schließlich sei verstattet, noch eine allgemeine Bemerkung Höbers zu berühren. Nachdem ich zur Ablehnung der Lipoidtheorie gelangt war und speziell für die lipoidlöslichen und unlöslichen Kolloide nachgewiesen hatte, daß dieselbe Gesetzmäßigkeit ihre Aufnehmbarkeit beherrschte, betonte ich, daß es bisher für die molekular gelösten Stoffe unerklärt geblieben ist, welche Wechselbeziehungen zwischen ihren physikalischen Eigenschaften und den statischen der Plasmahaut zur Folge haben, daß eine gewisse Gruppe dieser Verbindungen stets geschwind, eine andere dagegen regelmäßig langsamer oder gar nicht permeiert. Wenn ich in diesem Zusammenhange dem Umstande, daß gerade die physiologisch wichtigen Salze, Zucker und Aminosäuren sich unter den schwer permeierenden befinden, die Bedeutung zuerkannte, daß sie infolgedessen um so leichter regulatorisch bei Abgabe und Aufnahme beeinflußbar seien, so kann doch daraus unmöglich, wie Höber will, eine Zustimmung zu seiner schon erwähnten und von mir mehrfach zurückgewiesenen Unterscheidung von „physikalischer“ und „physiologischer“ Permeabilität herausgelesen werden. Vielmehr berechtigt uns bisher nichts dazu, anzunehmen, daß nicht alle molekular gelösten Stoffe auf gleiche Weise in die Zelle eindringen.

Zusammenfassung.

1. Die Lipoidtheorie Overtons ist wegen sehr zahlreicher schroffer Widersprüche gegen die Tatsachen aufzugeben, ebenso die Höberschen Hilfshypothesen von einer „physiologischen“ und einer „physikalischen“ Permeabilität.

2. Höber hat gegen meine Auffassung der Plasmahaut als eines Ultrafilters bei der Kolloidaufnahme keinen einzigen stichhaltigen Einwand beizubringen vermocht.

3. Die Ultrafiltertheorie vermag vielmehr restlos die diosmotischen Erscheinungen bei der Aufnahme von Farbstoffen zu erklären und hat sich auch für die zelleigenen Kolloide bewährt.

4. Es wurde bewiesen, daß die meist geringere Geschwindigkeit der **Speicherung** der elektronegativen und meist lipoidunlöslichen sauren Farbstoffe gegenüber basischen durch Pflanzenzellen lediglich in der **Art** der Speicherung, nicht aber in der **Permeabilität** ihren Grund hat.

5. Demnach kommt der elektrischen Ladung der Farbstoffteilchen, im Gegensatz zu einer Hypothese Höbers, keine erkennbare Bedeutung zu. Die Plasmahaut ist vielmehr für basische Farbstoffe nicht permeabler als für die sauren des gleichen Dispersionsgrades.

6. Die Transpiration ist der einzige Faktor, durch den die schnellere Aufnahme der Säurefarbstoffe durch Sprosse gegenüber Schnitten, die in der Lösung weilen, zustande kommt.

Enthält die Milch Phosphatide?

Von

Vladimir Njegovan.

(Aus dem kgl. kroat.-slav. landesagrikulturchemischen Institut zu Križevci, Kroatien.)

(Eingegangen am 24. Juni 1913.)

Seinerzeit unterzog ich alle bekannten Methoden zur Bestimmung der Phosphatide in der Milch einer Kritik[1]), in der ich auf die Unverläßlichkeit dieser Methoden hinwies. Indem z. B. Koch einerseits behauptet, daß das Lecithin in der Milch sich überhaupt nicht wie Fett verhält und deshalb auch nicht in besonderer Menge in den Rahm übergeht, ist nach Glikin andererseits das Lecithin in der Magermilch überhaupt nicht mehr nachweisbar; Schloßmann wieder bestreitet überhaupt die Anwesenheit des Lecithins in der Milch.

Die Unverläßlichkeit aller dieser Methoden beruht meiner Ansicht nach hauptsächlich darin, daß man bisher keine Methode besaß, um die Milch ohne starke Eingriffe, speziell der höheren Temperatur, vollständig zu trocknen. Es ist bekanntlich bei der Extraktion der Phosphatide die Hauptbedingung, daß das extrahierende Material vollständig trocken ist, worauf schon Thudichum hinwies. Da die bisher bekannten Trocknungsmethoden entweder nicht ganz einwandfrei oder mit großen Umständen verknüpft sind, versuchte ich die bekannte Natriumsulfatmethode zu diesem Zwecke brauchbar zu machen. Das Verfahren habe ich an dieser Stelle schon ausführlich beschrieben[2]); indem ich aber dasselbe inzwischen etwas vereinfacht habe, will ich es hier nochmals kurz folgen lassen.

---

[1]) Diese Zeitschr. **29**. 491, 1910.

[2]) Diese Zeitschr. **48**, 203, 1912.

100 ccm Milch wurden in einer Reibschale bis auf ca. 25 bis 30° in einem Wasserdampftrockenschranke erwärmt und nachher 70 g wasserfreies Natriumsulfat zugesetzt. Durch die Bildungswärme des $Na_2SO_4 + 10\,H_2O$ steigt die Temperatur auf die notwendigen 33°. Der flüssige Brei wird bei gewöhnlicher Temperatur von Zeit zu Zeit mit dem Pistill bearbeitet. In 2 bis 3 Stunden, je nach der Zimmertemperatur, erstarrt das Gemisch zu einer noch etwas feuchten, festen Masse. Dieselbe wird auf mehreren flachen Schalen oder großen Uhrgläsern in dünne Schichten verteilt und in einen hohen Vakuumexsiccator[1]) gebracht, in dem sich eine genügende Menge konzentrierter Schwefelsäure (in diesem Falle ca. 270 ccm), womöglich oberhalb des Trockengutes, befindet.

Es genügt, nachher den Exsiccator auf ca. 10 bis 15 mm zu evacuieren. In 2 bis 3 Tagen ist die Masse trocken und enthält nur einige Zehntelprozent Feuchtigkeit. Es ist gut, den Exsiccator während der Trocknungsdauer einige Male zu öffnen und das Trockengut sowie die Schwefelsäure, die in ihren oberen Schichten verdünnter wird als in den unteren, umzurühren. Die Wirkung der Schwefelsäure kann man steigern, indem man dieselbe in mehrere Schalen bringt und so ihre Oberfläche vergrößert. Die auf diese Weise getrocknete Milch wurde dann auf Vorhandensein der Phosphatide wie folgt untersucht:

Versuch 1.

100 ccm mit Natriumsulfat getrockneter Vollmilch wurden zweimal je 6 Stunden im Soxhletschen Extraktionspparat mit Chloroform extrahiert. Nachdem das Chloroform durch Destillation entfernt war, wurde der Rückstand mit Säuregemisch nach Neumann[2]) verascht und mit Ammoniummolybdat auf Phosphor geprüft. In beiden Extrakten konnte keine Spur Phosphor nachgewiesen werden. Die Extraktion wurde noch 6 Stunden im Landsiedelschen Heißextraktionsapparat[3]) mit gleichem Ergebnis wiederholt.

Versuch 2.

100 ccm getrockneter Milch wurden 8 Stunden mit Chloroform wie oben extrahiert. Das gewonnene fettreiche Extrakt war phosphorfrei.

---

[1]) Dafür eignet sich sehr gut der Exsiccator nach Kempf, Chem. Ztg. 33, 145, 1909.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 129, 1902; 43, 35, 1904.

[3]) Chem. Ztg. 26, 275, 1902.

Der Rückstand wurde nachher je 1, 4, 3, 8, 2, 6, 5 Stunden mit absolutem Alkohol extrahiert. Die bei jeder Extraktion gewonnene alkoholische Lösung wurde nach dem Erkalten von den festen Abscheidungen (Milchzucker, Casein) durch Filtration getrennt, eingedampft und nach Neumann auf Phosphor geprüft. In allen Fällen wurden kleine Mengen Phosphor nachgewiesen. Nachher wurde 6 Stunden mit Chloroform extrahiert, wobei der unbedeutende Extrakt keine Phosphorreaktion zeigte; bei nachfolgender 6stündiger Alkoholextraktion war wieder Phosphor im Extrakt nachweisbar.

Versuch 3.

100 ccm Vollmilch wurden nach der Trocknung mit absolutem, über Natrium destilliertem Äther 10 Stunden extrahiert. Das fettreiche Extrakt enthielt keinen Phosphor. Der Extraktionsrückstand wurde 24 Stunden mit 200 ccm Methylalkohol bei gewöhnlicher Temperatur digeriert, die klarfiltrierte methylalkoholische Lösung am Wasserbade eingedampft und im Vakuumexsiccator getrocknet. Der trockene Rückstand wurde, mit Chloroform aufgenommen, filtriert und die noch etwas opalescierende chloroformige Lösung eingedampft. Es hinterblieben 0,065 g einer fettigen Masse, die nach Neumann verascht, kaum bemerkbare Spuren gelben Niederschlags zeigte. Die kalte methylalkoholische Digestion wurde mit neuen 200 ccm Methylalkolol wiederholt. Der dabei resultierende fettige chloroformige Auszug wog 0,023 g und enthielt keine Spur Phosphor. Nach der dritten kalten 48stündigen Digestion wog der chloroformige Auszug 0,012 g und war phosphorfrei.

Nachher wurde das Pulver je 2mal mit Methylalkohol $^1/_2$ Stunde am Rückflußkühler gekocht. Der in Chloroform lösliche Teil der dabei gewonnenen und getrockneten alkoholischen Auszüge wog je 0,008 g und war ebenfalls phosphorfrei.

Versuch 4.

100 ccm Vollmilch wurden nach der Trocknung 10 Stunden mit Chloroform extrahiert. Der fettreiche Extrakt war phosphorfrei. Das extrahierte Pulver wurde mit kaltem absolutem Äthylalkohol wie bei Versuch 3 behandelt. Der getrocknete alkoholische Extrakt wurde mit 25 ccm absolutem Äther ausgezogen. Der filtrierte ätherische Auszug (0,015 g) zeigte nach der Veraschung nur Spuren gelben Niederschlages.

Das Milchpulver wurde nachher mehrere Male je $^1/_2$ Stunde mit absolutem Äthylalkohol ausgekocht, der trockene alkoholische Auszug mit 25 ccm absolutem Äther und 25 ccm Chloroform behandelt. Die klaren ätherischen und chloroformigen Auszüge, die nach dem Entfernen des Lösungsmittels ca. 0,005 g wogen, waren phosphorfrei.

Dabei will ich bemerken, daß der in absolutem Äther bzw. Chloroform unlösliche Teil des Alkoholextraktes zuweilen auch etwas Phosphor enthält, sonst aber hauptsächlich aus Milchzucker bestand.

Versuch 5.

100 ccm Magermilch (0,01 °/₀ Fett) wurden nach dem Trocknen 3 Stunden im Soxhletschen Extraktionsapparate mit absolutem Äthylalkohol extrahiert. Nach der Extraktion befanden sich im Kolben bedeutende Mengen fester Substanz (Milchzucker, Casein), die nach dem Erkalten von der alkoholischen Lösung durch Filtration getrennt wurden.

Der trockene alkoholische Extrakt wurde mit 25 ccm absolutem Äther und 25 ccm Chloroform ausgezogen. Der ätherische Auszug (0,069 g) zeigte etwas mehr Phosphor als bisher beobachtet wurde, so daß nach dem Überführen des Molybdänniederschlages in Magnesiumpyrophosphat das letztere gewogen werden konnte. Es wurden dabei 0,0008 g $Mg_2P_2O_7$ gefunden. Der chloroformige Auszug (0,010 g) war phosphorfrei.

Das extrahierte Pulver wurde noch wiederholt mit absolutem Alkohol bzw. absolutem Äther im Soxhletschen Apparate extrahiert, wobei keine in Äther oder Chloroform lösliche phosphorhaltige Substanz gewonnen werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse erhielt ich auch bei gekochter Milch, wobei neben Äthylalkohol auch Methylalkohol zur Extraktion verwendet wurde.

Versuch 6.

100 ccm getrockneter Vollmilch wurden 6 Stunden mit Aceton und 3 Stunden mit Benzol extrahiert. In beiden Extrakten wurde kein Phosphor nachgewiesen.

Versuch 7.

100 ccm Vollmilch wurden nach der Trocknung je 6 Stunden mit Petroläther (Sdp. 30 bis 50°), Benzin (Sdp. 60 bis 70°), Benzin (Sdp. 70 bis 80°), Benzin (Sdp. 80 bis 90°) extrahiert. Alle dabei resultierenden Extrakte waren phosphorfrei.

Nach den allen dabei gewonnenen Ergebnissen erhebt sich die Frage, ob die Milch überhaupt Phosphatide enthält? Die kleinen Spuren Phosphor, die bei der alkoholischen Extraktion beobachtet wurden, muß man kleinen Mengen übergegangenen Caseins bzw. seiner Zersetzungsprodukte zuschreiben. Diese Behauptung unterstützt der Versuch 2, bei dem immer kleine Mengen Phosphor nachgewiesen werden konnten, so viele Male man auch die Extraktion mit Alkohol wiederholte. Ich habe mich auch überzeugt, daß das Casein nach Hammarsten (Merck) in heißem absolutem Alkohol teilweise löslich ist — die alkoholische Lösung zeigte nach der Veraschung Phosphorreaktion.

Die kleinen Mengen Phosphor, die in ätherischen bzw. chloroformigen Auszügen bisweilen nachgewiesen wurden, kann man auch darauf zurückführen, daß die Lösungen nicht immer ganz klar zu filtrieren waren.

Es scheint weiterhin ausgeschlossen, daß der Natriumsulfatzusatz von Einfluß auf die Löslichkeit der Milchphosphatide wäre.

Die von Rosengreen, Siegfeld und Rosenbaum[1]) beobachtete Substanz dürfte kaum mit den Phosphatiden gleich sein, was die letzten zwei Forscher auch selbst hervorheben.

Zieht man noch die ganz konträren Befunde von Koch und Glikin in Betracht, so ist man gezwungen, anzunehmen, daß die Milch Phosphatide überhaupt nicht enthält und daß die bei verschiedenen Forschern beobachtete phosphorhaltige Substanz nicht mit den Phosphatiden identisch sein dürfte.

---

[1]) Chem. Centralb. 76, II, 275, 1905.

Das Schicksal des Cocains und Ekgonins im Organismus.

Von

Suleiman Rifâtwachdani (Konstantinopel).

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. Juni 1913.)

Die zurzeit geltende Anschauung über das Verhalten des Cocains im Organismus nimmt an, daß das Alkaloid bei länger dauerndem Kontakt mit den Geweben weitgehend zerstört wird. Diese Vorstellung stützt sich auf die Versuche von Wiechowski[1]), aus denen sich ergab, daß von den bei Hunden subcutan injizierten Alkaloidmengen (89 bis 312 mg) durchschnittlich nur 5 % im Harn wieder erschienen, während Kaninchen, die 89 bis 446 mg erhalten hatten, überhaupt kein Alkaloid ausschieden. Hiernach unterliegt das Cocain einer fast vollständigen Zersetzung im Tierkörper. Für eine rasche Zerstörung scheinen auch die Versuche Kohlhardts[2]) zu sprechen, denen zufolge bei Injektion von giftigen Cocainmengen in ein vorher mittels Gummischlauches abgeschnürtes Bein um so geringere Vergiftungserscheinungen auftraten, je länger mit der Lösung der Abschnürung gewartet wurde. Indessen brachten diese Versuche nicht den zwingenden Beweis für eine rasche lokale Zerstörung. Sie konnten ebensogut im Sinne einer stark verlangsamten Resorption gedeutet werden, nachdem Kleine[3]) bereits 1901 gezeigt hatte, daß aus einer abgeschnürten Extremität ein allmählicher Übergang der eingespritzten Substanzen (Ferrocyankalium und Strychnin) in den Blutkreislauf stattfindet.

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **46**, 155, 1901.

[2]) Arch. f. klin. Chir. **64**, 927, 1902.

[3]) Zeitschr. f. Hygiene **36**, 1, 1901.

Die im hiesigen Institut angestellten Versuche Grodes[1]) haben ergeben, daß bei Tieren die längere Darreichung von Cocain zu Erscheinungen führte, die als kumulative Wirkungen gedeutet werden konnten. Außerdem zeigten gelegentliche Befunde an Kaninchen, daß nach Zufuhr ungiftiger Cocainmengen mit einigen Alkaloidreagenzien im Harn positive Ergebnisse erhalten werden konnten. Damit war Veranlassung gegeben, an der Lehre von der raschen Zerstörung des Cocains im Tierkörper zu zweifeln und sein Schicksal im Stoffwechsel von neuem zu prüfen.

Die Versuche sind sämtlich an Kaninchen angestellt worden. Bei der Untersuchung des Harns und der in Betracht kommenden tierischen Gewebe wurde folgendermaßen verfahren.

Der in 24 Stunden entleerte Harn wird zunächst bei saurer Reaktion mit Benzol im Steudel-Kutscherschen Extraktionsapparat zur Entfernung von Farbstoff, Fett u. dgl. ausgezogen. Dann setzt man Ammoniak bis zur alkalischen Reaktion zum Harn und zieht mit erneuertem Benzol so lange aus, bis eine Probe des über dem Harn stehenden Benzols keine Reaktion mit Jodkaliumjodid mehr gibt.

Dieses Reagens wurde deswegen gewählt, weil es von den in Betracht kommenden Fällungsmitteln (Kaliumquecksilberjodid, Jodkaliumjodid, Phosphorwolframsäure) sich am empfindlichsten erwies. In einer Lösung von Cocainhydrochlorid 1:100000 ruft Jodkaliumjodid noch eine Trübung hervor, während die anderen Reagenzien versagen.

Die Extraktion des Cocains ist in ungefähr 24 Stunden beendet. Nach Entfernung des Benzols durch Abdestillieren und Eindampfen des Restes auf dem Wasserbade bleibt das Cocain zurück und wird nach Gordin[2]) titrimetrisch bestimmt.

Bei der Untersuchung von Muskeln und anderen tierischen Organen bringt man das möglichst fein zerkleinerte Objekt in einen Kolben und extrahiert am Rückflußkühler mit absolutem Alkohol. Diese Behandlung wird noch zweimal mit erneutem Alkohol wiederholt. Die vereinigten alkoholischen Auszüge werden filtriert, der Alkohol abdestilliert und zur Trockne ein-

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 67, 172, 1912.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 32, 2871, 1899.

gedampft. Der Rückstand wird mit kaltem Wasser ausgezogen und dann weiter, wie oben für den Harn angegeben ist, behandelt.

Übrigens bietet die Benzolextraktion im Apparat keine erheblichen Vorteile gegenüber dem einfachen Ausschütteln mit Äther im Scheidetrichter. Durch dieses Verfahren läßt sich das Cocain in wenigen Stunden dem zu untersuchenden Harn entziehen. Ich habe daher die Ätherausschüttlung in den letzten Versuchen durchweg benutzt.

Bei der Titration wurde die Anzahl der gebundenen Kubikzentimeter $^n/_{20}$-Säure mit dem von Gordin für Cocain angegebenen Faktor 0,0146 multipliziert, nachdem ich mich in mehreren Versuchen mit abgewogenen Mengen reinen Cocains davon überzeugt hatte, daß die von mir verwendete Säure denselben Wert lieferte.

Zur Prüfung der Zuverlässigkeit der Methode wurden je 100 ccm normaler Kaninchenharn mit abgewogenen Mengen Cocainhydrochlorid versetzt und analysiert.

Cocain zugesetzt g	Cocain gefunden g	%
0,130	0,133	102,3
0,057	0,054	94,7

Es wurden also im Mittel 98,5 % des dem Harn zugesetzten Cocains wiedergefunden.

Um die Ausscheidung des Alkaloids im Harn zu studieren, wurde zunächst einer Anzahl Kaninchen eine einmalige Dosis von 0,05 g Cocainhydrochlorid, entsprechend 0,0446 g Cocain subcutan eingespritzt und der innerhalb von 24 Stunden entleerte Harn untersucht. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle I.
Einmalige Verabreichung subcutan von 0,05 g Cocainchlorhydrat.
Harn von 24 Stunden.

Gewicht des Tieres g	Ausgeschiedene Menge g	Prozente der eingeführten Menge
2100	0,038	85,2
2100	0,023	51,5
1250	0,039	87,4
1520	0,028	62,7
1750	0,031	69,5
1520	0,021	42,1

Diese Versuche lassen erkennen, daß bei Kaninchen das Cocain nicht zerstört wird, sondern in Mengen von 42 bis 85 % im Harn ausgeschieden wird.

Zur näheren Charakterisierung des Cocains wurde die ausgefällte Jodcocainverbindung mit feuchtem Silberoxyd zersetzt und das mit Ammoniak alkalisch gemachte Filtrat mit Äther ausgeschüttelt. In dem nach Verdunsten des Äthers zurückbleibenden Rückstand wurden durch vorsichtigen Salzsäurezusatz Krystalle von Cocainhydrochlorid erzeugt, die unter dem Mikroskop identifiziert wurden. Ferner wurde die anästhesierende Wirkung auf die Zunge und die Erweiterung der Pupille des enukleierten Froschauges zur Feststellung benutzt.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, wie sich bei einem und demselben Kaninchen, das längere Zeit hindurch täglich mit Cocain gespritzt wurde, die Ausscheidung verhielt. Das Tier erhielt möglichst wasserreiches Futter, so daß an jedem Versuchstag Harn entleert wurde. Dieser Versuch war deshalb von Interesse, weil die schon oben erwähnten Versuche Grodes auf eine Anhäufung des längere Zeit verabreichten Alkaloids hinweisen.

Tabelle II.

Kaninchen 1750 g schwer, erhält täglich subcutan 0,05 g Cocainhydrochlorid, entsprechend 0,0446 g Cocain.

Versuchstag	Ausgeschiedene Menge g	Prozente der täglichen Einfuhr
1	0,015	33,6
2	0,021	47,1
3	0,023	52,8
4	0,022	49,3
5	0,022	49,3
6	0,025	56,1
7	0,039	89,4
8	0,047	107,8
9	0,050	112,1

Es wurden also von der innerhalb der Versuchsdauer eingespritzten Menge von 0,4014 g Cocain wieder ausgeschieden 0,264 g gleich 65,8 %. Leider ging das Kaninchen am 10. Versuchstage ein, so daß die Ausscheidung nicht weiter verfolgt werden konnte. Aber aus den zunehmenden Werten der

täglichen Ausfuhr scheint mir deutlich hervorzugehen, daß eine gewisse Anhäufung des Alkaloids im Körper stattfindet, die wohl imstande ist, die von Grode, wenn auch gerade nicht beim Kaninchen, so doch an Meerschweinchen, Katzen und Hunden beobachtete bei längerer Zufuhr sich einstellende Überempfindlichkeit zu erklären.

Wiederholt ist in diesen Versuchen der Harn nach der unten beschriebenen Methode auf Ekgonin untersucht worden, aber ohne Erfolg.

Obwohl diese Versuche lehrten, daß eine so weitgehende Zerstörung des Cocains im Tierkörper, wie sie auf Grund der Wiechowskischen Versuche bisher anzunehmen war, nicht stattfindet, habe ich in einer weiteren Versuchsreihe untersucht, wie sich das Cocain verhält, wenn man bei gleichzeitigem Abbinden eines Hinterbeins in dieses eine große Cocaindosis injiziert.

Diese Versuchsanordnung entspricht derjenigen Kohlhardts, der, wie oben bereits erwähnt, auf Grund der dadurch bewirkten Aufhebung oder Abschwächung der nach dem Lösen des Abbindungsschlauches auftretenden Intoxikationserscheinungen annimmt, daß das Cocain durch das Protoplasma unschädlich gemacht oder in irgendeine nicht toxisch wirkende Verbindung übergeführt würde.

Zunächst wurde an drei Kontrollversuchen unter Anwendung der oben beschriebenen Methode geprüft, wieviel von einer zu 50 g Kaninchenfleisch zugesetzten Cocainmenge (0,1 g Cocainhydrochlorid) wiedergewonnen werden konnte.

Zugesetzt Cocain	Gefunden Cocain	%
0,089	0,086	96,6
0,089	0,073	82,0
0,089	0,087	97,8

Die Resultate sind demnach befriedigend, es wurden im Mittel 92 % der zugesetzten Menge wiedergefunden.

Bei den Versuchen verfuhr ich so, daß den Kaninchen ein oder beide Hinterbeine über dem Kniegelenk mit einem Kautschukschlauch fest abgeschnürt wurden. Die für die Injektion gewählte Hautstelle wurde glatt abgeschoren, die Cocainlösung injiziert und die Einstichwunde mit Kollodium ver-

schlossen, um Verluste durch Ausfließen zu vermeiden. Nach 2 bis 3 Stunden wurden die Tiere durch Entbluten getötet, die Beine oberhalb der Abschnürung amputiert und samt Knochen und Haut so fein als möglich zerkleinert. Das Verfahren zur Bestimmung des Cocains ist bereits oben geschildert worden.

Die Ergebnisse von einigen dieser Versuche sind in Tabelle III zusammengestellt.

Tabelle III.

Nr.	Tiergewicht g	Cocain injiziert g	Cocain gefunden g	%
1a	2600	rechts 0,1785	rechts 0,146	81,8
b	—	links 0,1785	links 0,139	77,9
2	3400	0,1785	0,082	45,9
3	4670	0,1695	0,169	99,7

In drei anderen, mit gleichen Cocainmengen angestellten Versuchen wurden allerdings viel niedrigere Werte für Cocain in der abgebundenen Extremität ermittelt, die zwischen 20% und 30% lagen. Man kann aber meines Erachtens aus diesen Versuchen trotzdem schließen, daß das Cocain in den Geweben nicht irgendwie chemisch verändert wird. Hiergegen sprechen die hohen Werte, die in den Versuchen 1a, 1b und 3 gefunden wurden, Befunde, die sicherlich nicht für eine Entgiftung oder Zerstörung sprechen. Wenn in Versuch 2 und in anderen Versuchen die wiedergefundene Cocainmenge nur $^1/_4$ bis $^1/_2$ der injizierten betrug, so dürfte das wohl eher auf eine ungenügende Abschnürung zurückzuführen sein, die einen allmählichen Übertritt in den allgemeinen Kreislauf gestattete. Ob eine Bindung des Cocains durch Gewebsbestandteile stattgefunden hat, die bei der nachherigen Einwirkung des Alkohols wieder gelöst wurde, läßt sich auf Grund meiner Versuche natürlich nicht entscheiden.

Weiterhin möchte ich über einige Versuche berichten, die den Nachweis des Ekgonins im Harn und sein Verhalten im tierischen Organismus betreffen. Der Nachweis des Ekgonins stößt insofern auf Schwierigkeiten, als es zwar leicht in Wasser und auch ziemlich leicht in Alkohol löslich ist, sich aber nicht in Äther, Benzol und Chloroform löst; es läßt sich daher weder aus alkoholischer noch aus saurer Lösung ausschütteln. Zwar

läßt es sich durch Phosphorwolframsäure und einige andere allgemeine Alkaloidreagenzien aus dem Harn ausfällen; eine derartige Fällungsmethode, wie sie z. B. auch Wiechowski für den Nachweis im Harn benutzt hat, ist aber außerordentlich umständlich, und es erscheint zweifelhaft, ob dadurch kleine Mengen wiedergefunden werden können.

Bekanntlich ist der Methylester des Ekgonins in Äther löslich; es war daher zu versuchen, ob es nicht möglich sei das im Harn oder in den Extrakten tierischer Gewebe vorhandene Ekgonin in den Methylester überzuführen.

Dies gelingt bekanntlich ziemlich leicht, wenn man eine methylalkoholische Lösung von Ekgonin bei möglichst niedriger Temperatur mit Chlorwasserstoffgas behandelt. Man erhält nach dem Verdampfen des Methylalkohols das Hydrochlorid des Ekgoninmethylesters[1]).

Zunächst habe ich versucht, ob sich auf diese Weise zu Harn und Muskeln zugesetztes Ekgonin isolieren und nachweisen ließ.

Versuch 4.

In 100 ccm normalem Kaninchenharn wurden 0,2 g Ekgonin[2]) gelöst und der mit Salzsäure angesäuerte Harn auf dem Wasserbade völlig zur Trockne verdampft. Vorher hatte ich mich überzeugt, daß beim Ausschütteln des Harns mit Äther weder aus saurer noch aus alkalischer Lösung ein die Alkaloidreaktionen gebender Extrakt erhalten werden konnte. Der Eindampfrückstand des Harns wurde mit Methylalkohol wiederholt ausgezogen und das Filtrat bis zur völligen Sättigung mit trockenem Salzsäuregas behandelt. Nachdem der Methylalkohol verjagt war, wurde der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen und die filtrierte Lösung nach Zusatz von Ammoniak bis zur deutlich alkalischen Reaktion mit Äther wiederholt ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung hinterläßt beim Verdunsten des Lösungsmittels den Methyläther als ölige Tropfen, die sich in salzsaurem Wasser lösen.

---

[1]) Einhorn und Klein, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 21, 3336, 1888.

[2]) Für die bereitwillige Überlassung des Ekgonins und einiger Ekgoninverbindungen bin ich der Firma C. F. Boehringer & Söhne zu großem Dank verpflichtet.

Eine spezielle Reaktion für Ekgoninmethylester habe ich nicht auffinden können. Man erhält nur mit den üblichen Fällungsmitteln: Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Jodjodkalium, Kaliumquecksilberjodid und Bromwasser mehr oder weniger starke Niederschläge. Die empfindlichsten der genannten Reagenzien sind Phosphorwolframsäure und Jodjodkalium, die in Lösungen von Ekgoninmethylesterchlorhydrat 1:1000 starke Fällungen, bei 1:10000 Trübungen erzeugen.

Zur Identifizierung kann man die erweiternde Wirkung des Ekgoninmethylesters auf die Froschpupille benutzen. Am enukleierten Froschauge bringt eine $1^0/_0$ige Lösung eine mäßige Mydriasis hervor, während Ekgonin ohne Wirkung ist.

Zur Kontrolle habe ich normalen Kaninchenharn ohne Ekgoninzusatz in der gleichen Weise behandelt. Der Rückstand des Ätherextrakts gab, mit den genannten Alkaloidreagenzien geprüft, keine Trübungen oder Niederschläge.

Versuch 5.

Kaninchenfleisch, mit Ekgonin versetzt, wurde mit Alkohol am Rückflußkühler ausgekocht. Nach dem Erkalten wurde abfiltriert, das Filtrat zur Trockne gebracht, mit Methylalkohol aufgenommen und weiter wie oben verfahren. Auch hier fielen im Ätherextrakt die oben genannten Reaktionen positiv aus, während bei einem analogen Versuch ohne Ekgoninzusatz keine Fällungen erhalten wurden.

Nachdem sich durch diese Versuche die Methode als brauchbar für den qualitativen Nachweis gezeigt hatte, wurde untersucht, ob beim Kaninchen subcutan eingespritztes Ekgonin im Harn nachweisbar war. Der Tagesharn eines Kaninchens, dem 0,260 g Ekgonin in wässeriger Lösung injiziert wurde und das, beiläufig erwähnt, keinerlei Vergiftungserscheinungen darbot, wurde zunächst direkt mit Äther extrahiert. Das Ätherextrakt gab keine Alkaloidreaktionen. Nachdem der Harn in der oben geschilderten Weise verarbeitet worden war, fielen alle Reaktionen positiv aus. Damit ist gezeigt worden, daß Ekgonin im Harn ausgeschieden wird. Freilich gab dieser Versuch keine Auskunft, ob und in welchem Umfange das Ekgonin im Tierkörper verbrannt wird.

Um diese Frage zu lösen, war es nötig, eine Methode zur quantitativen Bestimmung des Ekgonins zu finden. Ich versuchte, den synthetisch gewonnenen Ekgoninmethylester nach dem Gordinschen Verfahren zu titrieren. Wenn 1 ccm $^{n}/_{20}$-Säure 0,0146 g Cocain entsprechen, so berechnet sich daraus für Ekgoninmethylester 1 ccm $^{n}/_{20}$-Säure 0,0098 g. Bei der öligen Beschaffenheit des Methylesters war es nun freilich nicht möglich, diese berechnete Zahl durch den Versuch zu kontrollieren. Zu dieser Schwierigkeit gesellte sich noch eine andere. In mehreren Versuchen ergab sich, daß die Veresterung des Ekgonins nicht quantitativ verläuft. So wurden in einem Kaninchenharn, dem 0,260 g Ekgonin zugesetzt waren, nur 0,160 g wiedergefunden, entsprechend 61 $^{0}/_{0}$. Bei einem anderen Versuch, in dem 0,445 g Ekgonin zu 50 g Kaninchenmuskeln zugefügt waren, wurden 0,258 g = 58 $^{0}/_{0}$ wiedergefunden. Hieraus ergibt sich, daß das Verfahren mit großem Fehler arbeitet und sich nur zum qualitativen Nachweis eignet. Trotzdem möchte ich zum Schluß noch über einen Versuch berichten, bei dem einem Kaninchen (1500 g) subcutan 0,308 g Ekgonin injiziert wurden und im Harn der ersten 24 Stunden auf die oben geschilderte Weise das Alkaloid titrimetrisch bestimmt wurde. Es wurden wiedergefunden 0,077 g, entsprechend 25 $^{0}/_{0}$. An den beiden folgenden Tagen war Ekgonin nur in quantitativ nicht bestimmbarer Menge im Harn nachweisbar. Hieraus läßt sich wenigstens die Tatsache entnehmen, daß das Ekgonin im Organismus nicht sehr leicht oxydabel ist.

Zusammenfassung.

1. Cocain wird vom Kaninchen in quantitativ bestimmbarer Menge im Harn ausgeschieden. Bei länger dauernder Zufuhr wächst die tägliche Ausscheidung im Harn.

2. Eine Zerstörung des Cocains bei längerer Berührung mit lebendem Gewebe scheint nicht stattzufinden.

3. Es wird eine Methode zum Nachweis des Ekgonins im Harn beschrieben und gezeigt, daß Ekgonin durch die Nieren ausgeschieden wird.

Ein Respirationsapparat mit selbstkontrollierender Sauerstoffbestimmung, verwendbar für kleine Tiere.

Von

L. S. Fridericia.

(Aus dem Institut für allgemeine Pathologie der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 30. Juni 1913.)

Mit 3 Figuren im Text.

Im Laufe der Zeit sind eine große Menge von Respirationsapparaten konstruiert und beschrieben worden, und die Prinzipien, nach welchen sie konstruiert sind, sind allgemein bekannt. Wenn ich dennoch gemeint habe, es könnte von Interesse sein, die Beschreibung von noch einem Respirationsapparate und die damit ausgeführten Kontrollversuche zu veröffentlichen, so ist es nicht deshalb, weil sich in der Konstruktion des Apparates etwas technisch wesentlich Neues vorfindet, sondern aus einem andern Grunde.

In dem Apparate sind nämlich zwei verschiedene Konstruktionsprinzipien vereinigt, deren jedes für sich vorher oft verwendet wurde, und mit dieser Vereinigung wurde erreicht, daß der Apparat selbstkontrollierend wurde, d. h. jedes Versuchsresultat gibt eine Garantie dafür, daß der Apparat während des Verlaufes des Versuches richtig funktionierte. Diese Selbstkontrolle wird in diesem Apparate durch sehr einfache Mittel erreicht und auf eine Weise, die, soviel mir bekannt, früher nicht angewendet wurde.

Die Kontrolle für die Bestimmung einer Größe bekommt man, indem man die Bestimmung auf zwei voneinander unabhängigen Wegen vornimmt.

So kontrollierte z. B. Pettenkofer[1]) seinerzeit die Kohlensäure- und Wasserbestimmung in seinem Respirationsapparate, indem er Stearinkerzen teils im Respirationsapparat, teils in einem Elementaranalyseapparat verbrannte und die Kohlensäure- und Wasserbestimmung in den beiden Fällen verglich.

Alle älteren Respirationsapparate waren jedoch nicht selbstkontrollierend. Man mußte sich damit begnügen, sie in besonderen Kontrollversuchen zu erproben, und sich darauf verlassen, daß der Apparat bei den eigentlichen Versuchen wie bei den Kontrollversuchen funktioniert hatte. Die einzige Form für selbstkontrollierende Respirationsapparate, die bisher angewendet wurde, sind die sogenannten Respirationscalorimeter (Rubner 1894, Atwater und Rosa 1899, Benedict und Milner 1907 u. a.). In den Respirationscalorimetern, wo die Energieumsetzung des Versuchsindividuums auf zwei Wegen bestimmt wird: direkt und indirekt, ist die Kontrolle sehr effektiv, denn in der indirekten Bestimmung von der Energieumsetzung treten alle die Größen auf, die während der Versuche gemessen wurden. Der einzige Übelstand der Respirationscalorimeter ist, daß sie sehr kostspielig zu bauen sind und ein großes Personal zur Bedienung brauchen.

Der Respirationsapparat, der in folgendem beschrieben werden soll, ist billig und kann mit Leichtigkeit von einer Person überwacht werden. Der Apparat ist trotzdem selbstkontrollierend, aber dies wird durch Bestimmung einer andern Größe als der der Energieumsetzung auf zwei Wegen, nämlich der der Sauerstoffaufnahme des Versuchstierchens während des Versuches erreicht. Die Sauerstoffaufnahme des Versuchstieres wird teils direkt, teils indirekt bestimmt, und der Versuch ist nur dann brauchbar, wenn diese beiden voneinander unabhängigen Sauerstoffbestimmungen übereinstimmen. Die indirekte Sauerstoffbestimmung schließt die Bestimmung der Kohlensäure- und Wasserausscheidung des Tieres mit ein, so daß die Kontrolle sehr weitgehend ist.

Wenn nicht früher ein solcher Stoffwechselapparat beschrieben wurde, der auf diese Weise, nämlich durch Bestimmung der Sauerstoffaufnahme auf zwei Wegen selbstkontrollierend wurde, so ist die Ursache sicherlich darin zu suchen, daß es

[1]) Liebigs Annalen 1862/63, II. Suppl.-Bd., S. 1.

gewisse Schwierigkeiten bei einer genauen indirekten Bestimmung der aufgenommenen Sauerstoffmenge gibt.

Was der indirekten Bestimmung der Sauerstoffaufnahme zugrunde liegt, ist wie bekannt, daß die Differenz zwischen dem Gewicht des Tieres am Schluß und am Beginn eines Versuches gleich sein muß der Differenz zwischen den Gewichten seiner Aufnahmen und seiner Ausscheidungen während des Versuches. Kennt man deshalb das Gewicht des Tieres vor und nach dem Versuche, sowie das Gewicht all seiner festen, flüssigen und luftförmigen Ausscheidungen, und außerdem das Gewicht aller seiner Aufnahmen, ausgenommen des Sauerstoffes, so kann die aufgenommene Sauerstoffmenge aus einer einfachen Gleichung gefunden werden. Auf diese indirekte Weise versuchten z. B. Pettenkofer und Voit 1862[1]) die Sauerstoffaufnahme bei Hunden mittels des Pettenkoferschen Respirationsapparates zu bestimmen. Es hat sich später gezeigt, daß deren Resultate fehlerhaft waren und die Ursachen hierfür waren folgende. Die wichtigste war, daß die Bestimmung jener Menge Wasserdampf, den das Tier während des Versuchs abgibt, unzuverlässig war. Es wurde nämlich nur die Menge von Wasserdampf in jener Luft, mit der die Tierkammer des Respirationsapparates ventiliert wurde, bestimmt, aber in der Tierkammer selbst, an ihren Wänden usw. konnten während des Versuches bedeutende Mengen von Wasserdampf verdichtet werden, oder es konnte umgekehrt Wasserdampf aus der Tierkammer abgegeben werden. Voit stellte später[2]) eine Reihe von beschwerlichen Versuchen an, um die Wasserbestimmung im Apparat besser zu machen, aber dies gelang nur unvollkommen. Die andere Ursache für die Unverläßlichkeit bei der indirekten Sauerstoffbestimmung war, daß das Gewicht des Versuchstieres sich beständig veränderte, während man es wog, oder in der Zeit, die zwischen dem Wiegen und dem Beginn oder Schluß des Versuches lag.

Benedict hat 1910 die Schwierigkeiten überwunden, die mit der indirekten Sauerstoffbestimmung verknüpft sind[3]). Die Methode, die bei diesen Versuchen angewendet wurde, war jedoch allzu kompliziert, um immer als Kontrolle bei Sauerstoffbestimmungen in gewöhnlichen Stoffwechselversuchen gebraucht zu werden, und Benedict hat sie auch später nicht angewendet.

Es gibt jedoch eine einfache Methode, um indirekt des Tieres Sauerstoffaufnahme zu bestimmen. Die Methode wird von Haldane[4]) angegeben, hat jedoch nicht soviel Anwendung gefunden, als sie verdient. Haldane umging die obengenannten Schwierigkeiten durch Wiegen der ganzen Tierkammer mit dem

---

[1]) l. c.

[2]) Zeitschr. f. Biol. **11**, 126, 1875.

[3]) The american Journ. of Physiol. **26**, 15, 1910.

[4]) Journ. of Physiol. **13**, 419, 1892.

Tier darin, vor und nach dem Versuche. Dadurch spielte es weder eine Rolle, ob das Wasser in der Tierkammer verdichtet, noch ob das Gewicht des Tieres verändert wurde, denn das Gewicht der geschlossenen Kammer mit dem Tier darin ließ sich genau bestimmen. Die Ventilationsluft ging in Haldanes Apparat erst durch eine Flasche mit in Schwefelsäure getränkten Bimssteinstücken; hier wurde der Wasserdampf absorbiert; in einer anderen Flasche mit Natronkalk wurde die Kohlensäure der Ventilationsluft absorbiert, und in einer dritten das Wasser, das der Natronkalk abgab. Der Tierbehälter mit dem Versuchstier darin und die drei Absorptionsbehälter wurden vor und nach dem Versuch gewogen. Die Summe der Gewichte wird größer sein am Ende des Versuches als am Beginn desselben, und die Gewichtszunahme gibt die Größe der Sauerstoffaufnahme an. Haldane machte Kontrollversuche mit Wasser- und Kohlensäurebestimmungen in seinem Apparat und meinte, daß der Fehler bei der indirekten Sauerstoffbestimmung unter 2 cg bliebe, wenn man kleinere Tiere verwende. Direkt hat Haldane die Sauerstoffbestimmung nicht kontrolliert.

In dem Respirationsapparat, der hier beschrieben werden soll, wurde Haldanes Methode für die indirekte Bestimmung der Sauerstoffaufnahme angewendet. Der Apparat ist für Versuche mit kleineren Tieren eingerichtet. Vorläufig sind bloß Ratten verwendet worden. Fig. 1 zeigt ein schematisches Bild des Apparates; zuerst sollen jene Teile des Apparates beschrieben werden, die zur indirekten Sauerstoffbestimmung dienen, nämlich der Tierbehälter *D* und die Absorptionsbehälter *A*, *B* und *C*.

Das Versuchstier (Ratte) befindet sich in dem Drahtkäfig, der auf einem Aluminiumtrichter *t* steht, der in einen kleinen Behälter *u* mündet, in welchem sich der Urin des Tieres ansammelt. Die untere Mündung des Trichters ist mit einer perforierten Platte bedeckt, worauf sich die Exkremente sammeln. In dem Käfig finden sich Eß- und Trinkschüsselchen und oben ist ein Thermometer angebracht. Käfig, Trichter und Urinbehälter sind in einem luftdichten Messingzylinder *D* angebracht, dessen Deckel aus einer an einen Messingring festgekitteten Glasplatte besteht.

Der Rand des Messingbehälters hat einen Falz, der in eine

Rille im Deckel paßt; dazwischen wird ein Gummiring gelegt, und der Deckel wird an vier losen Bügeln mit Schrauben festgeschraubt. Drei Glasröhren mit geschliffenen Hähnen führen in den Messingbehälter. Zwei sind zur Zu- und Ableitung der ventilierenden Luft; der dritte Hahn hat capillare Durchbohrung und dient zur Untersuchung der Luft in der Tierkammer am Beginn und am Ende des Versuches, um zu konstatieren, ob die Luftzusammensetzung dort sich verändert hat, denn darauf

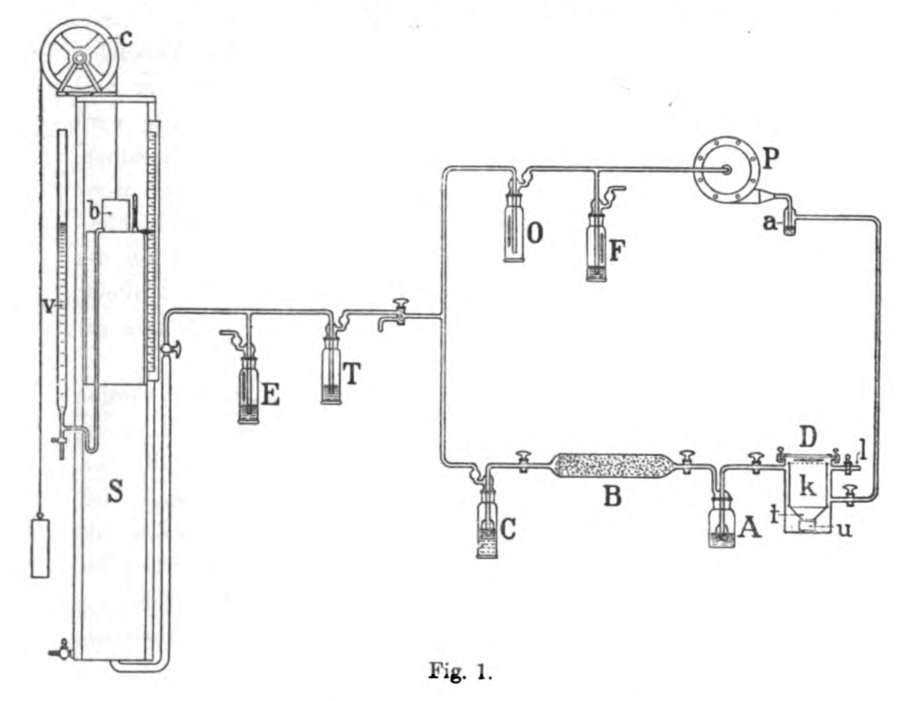


Fig. 1.

muß natürlich Rücksicht genommen werden. Hat man Übung in Benutzung des Apparates, so ist es übrigens leicht, sich zu sichern, daß die Zusammensetzung der Luft am Beginn und am Ende des Versuches fast gleich ist; die Luftproben werden in Petterson-Bohrs Luftanalyseapparat analysiert.

Der Messingbehälter *D* ist nicht größer, als daß er auf einer großen, analytischen Wage gewogen werden kann mit 1 mg Genauigkeit. Die Wage war im selben Raum wie der Respirationsapparat aufgestellt, was von Wichtigkeit ist. (Temperatur.) Ohne Ratte wiegt *D* ca. 1140 g, selbst mit großen

Ratten also bedeutend unter 2 kg, welches die Maximalbelastung der verwendeten Wage ist. Während des Wiegens müssen alle Hähne geschlossen sein; vor dem Wiegen wird der eine einen Augenblick geöffnet, damit der Druck in dem Behälter dem Barometerdruck, der abgelesen wird, gleichkomme. Die Temperatur im Behälter ist auch auf seinem Thermometer abzulesen; sie ist wichtig, da das Gewicht des Behälters bei gleichem Barometerstand 14 mg für 1° Temperaturzunahme abnimmt.

Die drei Absorptionsbehälter *A*, *B* und *C* werden auch gewogen mit 1 mg Genauigkeit. In *A* wird der Wasserdampf der Ventilationsluft durch konzentrierte Schwefelsäure absorbiert. Haldanes Absorptionsmittel: schwefelsäure-durchtränkte Bimssteinstücke haben mir nämlich bei langwierigen Versuchen keine verläßlichen Resultate ergeben. Im Behälter *B* wird die Kohlensäure von Natronkalk, zubereitet nach Haldanes Vorschrift, absorbiert und in der Schwefelsäureflasche *C* der Wasserdampf, den der Natronkalk abgibt. Die Schwefelsäureflaschen *A* und *C* haben geschliffene Glasstopfen und einen Waschapparat, der von Folin[1]) für Ammoniakbestimmungen angegeben ist. Die Luft dringt durch kleine Löcher in die Schwefelsäure und die Wasserabsorption wird dadurch vollständig, selbst bei schneller Ventilation. Nach meinen Kontrollversuchen können die Flaschen bei einer Ventilationsgeschwindigkeit von ca. 2 Liter Luft in der Minute bei 100 ccm Schwefelsäure 19 g Wasser ohne Verlust aufnehmen. Eine ähnliche Zahl fand Benedict[2]) für recht komplizierte Wasserabsorptionsapparate mit Schwefelsäure, so daß also die Folinschen Flaschen zufriedenstellend arbeiten. Auch der Behälter *B* hat einen geschliffenen Glasstopfen. Fig. 1 zeigt seine Form. — Während des Versuches werden Behälter, Tierkammer usw. durch kurze Stücke Vakuumschlauch verbunden, die an den Glasröhren mittels Kupferdraht befestigt werden. In den Schlauchstücken stoßen die Glasrohre zusammen. Die Schlauchstücke wurden vor und nach dem Versuche oft gewogen. Sie verändern ihr Gewicht nur in Bruch-

[1]) Abderhaldens Handbuch d. biochemischen Arbeitsmethoden 5, I. Abt., 286, 1911.

[2]) U. S. Departm. of Agriculture. Off. of experim. Stations Bull. 175, 1907.

teilen von Milligramm, was nicht von Bedeutung ist. — Die Ventilation im Apparat geschieht durch ein Zentrifugalgebläse (*P* in Fig. 1), das nachstehend erklärt werden soll.

Um die Vollständigkeit der Wasser- und Kohlensäureabsorption zu kontrollieren und zu beurteilen, wie hoch sich die Wiegefehler belaufen können, wurden mit dem Apparat zwei Reihen von Kontrollversuchen vorgenommen hinsichtlich der Genauigkeit der Wasser- und Kohlensäurebestimmung. Bei den Kontrollversuchen der Wasserbestimmung perlte die Ventilationsluft durch eine Waschflasche mit Wasser, aus dem die Kohlensäure ausgekocht war. Diese Waschflasche war während der Kontrollversuche zwischen den Zentrifugalbläser *P* und die Tierkammer *D* eingeschoben. Die Waschflasche sollte an Gewicht um so viel abnehmen, als die Absorptionsflasche *A* und der Tierbehälter *D* zusammen zunahmen. Die Summe der Gewichtsveränderungen der Behälter *B* und *C* sollte gleich Null sein. Dadurch erhielt man in der Wasserkontrollbestimmung teils die Genauigkeit der Wasserbestimmung, teils die Summe der Wiegefehler. Bei den Kontrollversuchen über Kohlensäurebestimmung wird die Kohlensäure in einem Apparat dargestellt, der von der äußeren Luft ganz abgeschlossen ist und der geschlossen vor und nach dem Versuch gewogen wird. Fig. 2 zeigt den einfachen Apparat.

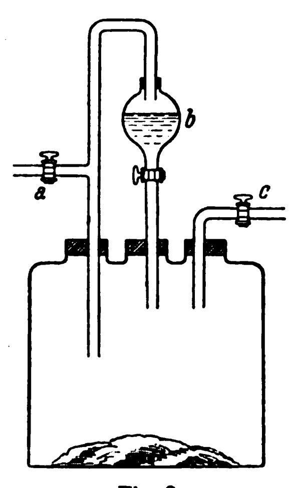


Fig. 2.

Die Röhre *a* wurde mit der Leitung des Zentrifugalbläsers verbunden, die Röhre *c* mit der Tierkammer und von dem Scheidetrichter *b* tropfte während des Versuches verdünnte Schwefelsäure auf reines Kaliumcarbonat. Vor Schluß des Versuches wurde der Hahn *b* geschlossen und der Apparat wurde von der Ventilationsluft so lange durchgespült, bis er kohlensäurefrei wurde. Die Ventilationsgeschwindigkeit war bei den Kontrollversuchen dieselbe wie bei den späteren Tierversuchen; ca. 2 l per Minute. Tabelle I und II zeigen das Resultat der Kontrollversuche.

Tabelle I.
Kontrollversuche von Wasserbestimmungen.

Nr.	Dauer	Wasser		Fehler		Summe d. Wiegefehler
		zugesetzt	gefunden			
	Std.	g	g	mg	%	mg
1	3,75	2,256	2,263	+ 7	0,3	+ 8
2	4,00	2,959	2,939	− 20	0,7	− 21
3	2,50	3,095	3,091	− 4	0,1	− 5
4	3,42	4,184	4,174	− 10	0,2	− 11
5	4,33	5,531	5,531	0	0,0	+ 2

Tabelle II.
Kontrollversuche von Kohlensäurebestimmungen.

Nr.	Dauer	Kohlensäure		Fehler	
		zugesetzt	gefunden		
	Std.	g	g	mg	%
6	0,50	0,672	0,689	+ 17	2,5
7	1,42	2,315	2,322	+ 7	0,3
8	1,25	2,620	2,615	− 5	0,2
9	2,00	4,273	4,267	− 6	0,1

Die Kontrollversuche zeigen, daß die Absorption in beiden Reihen eine vollständige gewesen ist. Die Fehler in den Bestimmungen gehen nach beiden Seiten und sind hauptsächlich Wiegefehlern zuzuschreiben. Alle Wiegungen wurden mit 1 mg Genauigkeit vorgenommen. Demnach sollte die Summe der Wiegefehler höchstens 10 mg sein, da 5 Wiegungen vor und 5 Wiegungen nach jedem Versuche gemacht sind. In der Regel ist die Summe der Wiegefehler auch weniger als 10 mg gewesen, bei einzelnen Versuchen ist sie aber doch ca. 20 mg, was sicherlich einem unvollständigem Temperaturausgleich zuzuschreiben ist. Nach diesen Versuchen sollte der Fehler in der indirekten Sauerstoffbestimmung immer unter 20 mg sein; d. h. daß bei Versuchen mit Ratten der Fehler bei der indirekten Sauerstoffbestimmung unter 1 % sein müßte bei einer Versuchsdauer von 3 Stunden, für länger dauernde Versuche nur wenige pro Mille.

Wie erwähnt, ist der Apparat außerdem für direkte Bestimmungen der Sauerstoffmenge, die das Versuchstier aufnimmt, eingerichtet und ist deshalb auch nach dem Regnault-Reisetschen Prinzip gebaut. Als Modell wurde der Respirationsteil des

Apparates genommen, den Benedict und Milner[1]) beschrieben haben, mit einer beständig zirkulierenden Luftmenge. Diese Vereinigung der Haldaneschen Respirationsapparatstype mit der Benedictschen ist das einzige Neue an diesem beschriebenen Apparat; sie bewirkt, daß der Apparat selbstkontrollierend wird.

Man stellt 4 Anforderungen an einen Apparat mit direkter Sauerstoffbestimmung, nämlich: 1. daß die Sauerstoffmenge, die in den Apparat eindringt, gemessen werde; aber damit die eingedrungene Sauerstoffmenge ein Maß für die Sauerstoffaufnahme des Versuchstieres sein kann, müssen die drei folgenden Bedingungen erfüllt werden; 2. daß der Apparat luftdicht sei; 3. daß der Druck im Apparat konstant gehalten werde oder daß seine Schwankungen bestimmt werden; 4. daß die Temperatur im Apparat konstant sei oder ihre Schwankungen bestimmt werden.

In folgendem soll mit wenigen Worten beschrieben werden, wie diese vier Forderungen in diesem Apparate erfüllt werden. Fig. 1 zeigt, wie die abgeschlossene Luftmasse des Apparates von dem Zentrifugalbläser *P* durch die Behälter *a*, *D*, *A*, *B*, *C* und *O* zurück zu *P* zirkuliert.

1. Messung der eintretenden Sauerstoffmenge. (Alle Buchstaben der folgenden Beschreibung beziehen sich auf Fig. 1.) Der Sauerstoff tritt in den Apparat ein von einem genau ausbalancierten Spirometer *S*. Um die Spirometerglocke leicht beweglich zu machen, geht das Rad *c* im Kugellager. Es wurde Alfred Lehmanns Methode angewendet, um die Veränderungen des Auftriebes der Spirometerglocke zu kompensieren; oben auf der Spirometerglocke befindet sich ein Wasserbehälter *b*, der durch ein festes Seitenrohr *v* nach und nach, wie die Glocke sinkt, mit Wasser gefüllt wird. *v* und *b* sind durch einen dünnen Gummischlauch verbunden. Mit einer Lupe und einem Lineal kann die Höhe der Spirometerglocke mit 0,1 mm Genauigkeit abgelesen werden. Die Spirometerglocke ist ausgemessen und kalibriert. 0,1 mm Höhenunterschied in der Stellung der Glocke entspricht 2,56 ccm oder 3,7 mg Sauerstoff. So hoch kann sich also der Ablese-

[1]) l. c.

fehler bei der direkten Sauerstoffbestimmung belaufen. Die Spirometerablesung muß natürlich für Druck, Temperatur und Feuchtigkeit korrigiert werden. In der Waschflasche *T*, die konzentrierte Schwefelsäure enthält, wird der Sauerstoff getrocknet, bevor er in den Apparat eintritt.

2. Die Luftdichte des Apparates. Es wurde besprochen, wie der Tierbehälter und die Verbindungsstücke luftdicht gemacht wurden. Es erübrigt, noch den Zentrifugalbläser *P* zu besprechen, der die Luft durch den Apparat treibt. Fig. 3 zeigt die Konstruktion des Bläsers. (Die Buchstaben in der folgenden Beschreibung des Zentrifugalbläsers beziehen sich auf Fig. 3.)

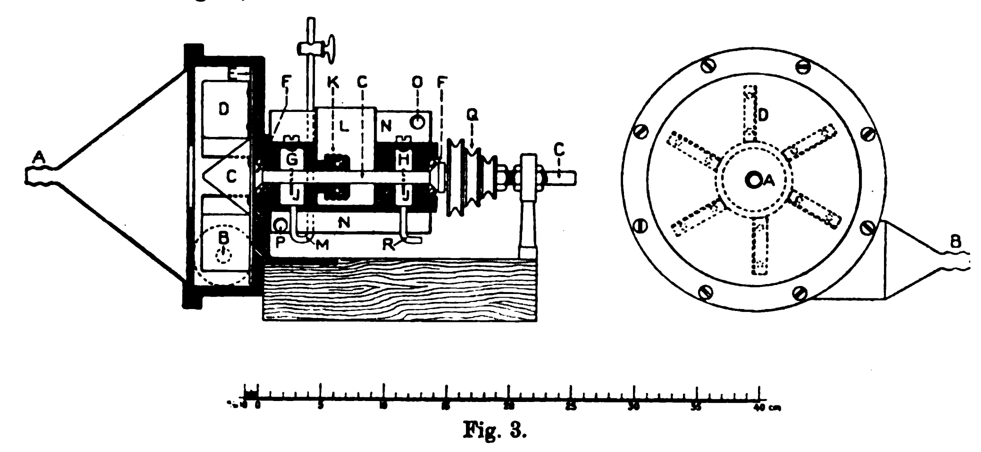


Fig. 3.

Es ist ein gewöhnlicher Zentrifugalbläser mit vier radial gestellten Flügeln *D* auf einer kreisförmigen Gußeisenscheibe *E* mit einer kegelförmigen Ausbiegung an der Achse *C*. Dies ist in einen gußeisernen Behälter eingeschlossen; die Luft wird bei *A* eingesaugt und bei *B* ausgeblasen. Der schwierige Punkt bei Konstruktion des Bläsers war, das Achsenlager absolut luftdicht zu bekommen. Dies wurde erreicht, indem man einen Teil der Achse in halbflüssigem Öl rotieren ließ. Die Achse *C* läuft in den Kugellagern *FF*; sie passiert zwei Luftkammern *G* und *H* und in der Mitte den Behälter *L* mit dem halbflüssigen Öl (Automobilöl). *J* und *K* sind Schmiereinrichtungen; die Glasröhren *M* und *R* werden halb mit Schmieröl gefüllt; die ganze Achse mit Zubehör ist in das Wasserbad *N* eingeschlossen,

das diese kühlt und dessen Wasser durch die Zu- und Ablauföffnungen *P* und *O* erneuert wird. Ein Motor wirkt auf die Riemscheibe *Q* und dreht den Bläser 3400 mal in der Minute, wodurch im Apparat eine Ventilation von ca. 2 l in der Minute erreicht wird. (Der Bläser ist von dem Mechaniker des Institutes D. Gläsel erbaut.) (Die Buchstaben in folgendem weisen wieder auf Fig. 1.)

Hinter dem Bläser befindet sich ein kleines Schwefelsäureventil *a*, das die Öltropfen auffängt, die vom Bläser heruntertropfen können. Das lange Glasrohr, das in Fig. 1 *a* mit dem Tierbehälter *D* verbindet, ist im wirklichen Apparat ganz kurz.

3. Die Druckregulation im Apparat. Die Waschflasche *T*, die konzentrierte Schwefelsäure enthält und die zwischen den Spirometer und den Apparat eingeschoben ist, dient nicht bloß dazu, den Sauerstoff zu trocknen, sondern ist auch außerdem Druckregulator. Sobald der Druck an dieser Stelle des Apparates mehr sinkt, als es der Schwefelsäurehöhe in *T* entspricht, tröpfelt Sauerstoff vom Spirometer herein. Die beiden Waschflaschen *E* und *F* enthalten Schwefelsäure und dienen nur als Manometer mit Bezug auf den Druck im Spirometer und im Apparat. (Deshalb sind Milchglasskalen an ihrem Rohr angekittet.) Der Spirometerdruck muß immer dem Druck der Atmosphäre gleich sein. *E* und *F* dienen nur dazu, um während des Versuches die Funktion des Apparates kontrollieren zu können. Da die Druckregulierung nur bei der Waschflasche *T* vor sich geht, so wird der Druck im Apparat nur konstant gehalten im Verhältnis zum Barometerdruck, der deshalb an Zeitpunkten, die von Interesse sind, abgelesen werden muß. Da der Rauminhalt des Apparates und des Spirometers bekannt sind, kann der Einfluß der Barometerschwingungen aus einer einfachen Formel ausgerechnet werden.

4. Die Temperaturregulierung. Die Temperatur wird in dem ganzen Raum, in dem der Stoffwechselapparat aufgestellt ist, durch einen Gasofen mit einem Rouxschen Regulator reguliert. Die Temperatur im Raum schwankt höchstens 1°. Im Respirationsapparat sind Thermometer bei *D*, *S*, *O* und *F* angebracht, die mit 0,1° Genauigkeit nach jeder Messung abgelesen werden.

In der Korrektionsformel für die Spirometerablesung wurde

außerdem auf die Wasserdampfspannung im Tierbehälter Rücksicht genommen.

Der maximale Fehler, der bei der direkten Sauerstoffbestimmung durch Ablesungsfehler am Barometer und Thermometer vorkommen kann, ist im ganzen 12 mg. Da der maximale Ablesungsfehler an dem Spirometer höchstens 3,7 mg war, wird der berechnete Maximalfehler in der direkten Sauerstoffbestimmung 16 mg betragen.

Es ist notwendig, ein paar Worte über den Prozentsatz von Sauerstoff in der Luft des Apparates hinzuzufügen. Da der Sauerstoff des Spirometers nicht vollständig rein ist, sondern ein paar Prozente Stickstoff enthält, wird der Prozentsatz an Sauerstoff in der Luft des Apparates etwas sinken, wenn der Sauerstoff, den das Versuchstier braucht, nach und nach vom Sauerstoff des Spirometers ersetzt wird. Wenn als Versuchstiere große Ratten verwendet werden, kann der Sauerstoffprozentgehalt um 6 bis 7 % in 24 Stunden sinken. Um die Sauerstoffprozente im Apparat ungefähr mit jenen der Atmosphäre gleich zu halten, ist die Flasche *O* (Fig. 1) eingeschoben. Diese wird am Beginn jedes Versuches mit Sauerstoff gefüllt, ihre Größe ist empirisch bestimmt und hängt von der Größe der verwendeten Versuchsratte ab, so daß der Prozentsatz Sauerstoff am Beginn des Versuches ein wenig höher ist im Apparat als der der Atmosphäre und bei seiner Beendigung gleich oder ein wenig niedriger. Die Luftzusammensetzung im Apparate wird, wie früher berichtet, durch Analyse der Luftproben, die aus dem Tierbehälter genommen werden, kontrolliert. Bei Analyse dieser Luftproben kann man außerdem sehen, ob die Ratte verbrennbare Luftarten ausgeschieden hat. Jedoch haben sich selbst bei 24stündigen Versuchen bei irgendeinem der bisher ausgeführten Tierversuche nachweisbare Mengen hiervon in der Luft des Apparates nicht angesammelt.

Der Verlauf eines Versuches ist folgender: Zuerst wird der Käfig mit der Ratte, der im vorhinein gewogen ist, in den Tierbehälter gesetzt, der geschlossen wird; der Bläser wird jetzt in Gang gesetzt, und der Tierbehälter wird vor dem Versuch ca. 1 Stunde mit trockener Luft ventiliert. Dies gegeschieht, um die Temperatur im Bläser auszugleichen und um eine passende Luftzusammensetzung im Tierbehälter zu be-

kommen. Während dies vor sich geht, werden alle Absorptionsbehälter gewogen. Hierauf wird eine Luftprobe aus dem Tierbehälter genommen, der dann vom Bläser getrennt wird, worauf dessen Hähne geschlossen werden. In diesem Augenblick beginnt der Versuch. Der Zeitpunkt wird notiert, sowie die Stellung der Spirometerglocke, der Barometerstand und die Temperatur auf allen Thermometern. Jetzt wird der vollständig geschlossene Tierbehälter gewogen mit der Ratte darin. Dies kann Schwierigkeiten verursachen, wenn das Tier unruhig ist; in einem solchen Falle läßt sich nichts tun, als einen ruhigen Augenblick abzuwarten. — Hierauf werden alle Teile des Apparates zusammengesetzt, die Thermometer abgelesen und der Bläser in Gang gesetzt. Dann werden die Manometerflaschen *E* und *F* abgelesen. — Ganz die gleichen Manipulationen werden in umgekehrter Richtung bei Beendigung eines Versuches gemacht. Im Anhang findet sich (etwas zusammengedrängt) das Protokoll über einen Versuch.

Während des Verlaufes eines Versuches kann der Sauerstoffverbrauch des Tieres für so kurze Perioden abgelesen werden als man Lust hat. Es ist jedoch nicht ratsam, öfter als jede halbe Stunde abzulesen. Jede Ablesung muß für Druck und Temperatur nach einer Korrektionsformel korrigiert werden.

Jeder Tierversuch im Apparat ist ja ein Kontrollversuch über die Genauigkeit der Sauerstoffbestimmung. Wie erwähnt, sind die Fehler bei der indirekten Bestimmung höchstens 20 mg, in der Regel jedoch weniger als 10 mg, während die Fehler bei der direkten Sauerstoffbestimmung höchstens mit 16 mg berechnet werden. Die beiden Bestimmungen sollten also höchstens 36 mg voneinander abweichen, in der Regel weniger als 26 mg.

In Tabelle III sind die Resultate der Sauerstoffbestimmungen in den bisher gelungenen Tierversuchen angeführt.

Die Resultate der Versuche bekräftigen, wie zu ersehen, die Richtigkeit der angestellten Fehlerberechnung. Die Versuche sind nach ihrer Dauer angeführt. Der kürzeste ist auf $2^1/_2$ Stunden, die vier längsten auf 24 Stunden ausgedehnt. Es wurden Ratten von sehr verschiedener Größe und Alter gewählt. Wie aus der letzten Kolonne zu ersehen ist, ist die prozentuelle Abweichung zwischen der direkten und der indirekten Sauerstoffbestimmung sehr gering, bei den lang andauernden Versuchen

immer unter 0,5 %, ja bei den drei 24stündigen Versuchen unter 1 ‰. Nach einer größeren Genauigkeit zu streben, wäre ganz unnütz.

Tabelle III.

Tierversuche (mit Ratten) (Kontrollversuche über Sauerstoffbestimmung).

Nr.	Dauer	Gewicht der Ratte	Sauerstoffverbrauch direkt bestimmt	Sauerstoffverbrauch indirekt bestimmt	Fehler	
	Std.	g	g	g	mg	%
10	2,50	258,4	1,506	1,515	− 9	0,60
11	3,25	274,0	1,692	1,713	−21	1,20
12	3,50	183,1	1,820	1,820	0	0,00
13	3,57	251,4	1,909	1,915	− 6	0,30
14	4,22	222,0	2,192	2,200	− 8	0,40
15	5,25	212,3	2,555	2,563	− 8	0,30
16	8,50	259,4	3,808	3,782	+26	0,70
17	9,30	224,4	4,636	4,645	− 9	0,20
18	9,42	245,0	4,944	4,921	+23	0,50
19	24,00	50,7–43,7 [1])	4,952	4,928	+24	0,05
20	24,00	65,2–56,0	6,288	6,282	+ 6	0,09
21	24,00	314,1–283,1	14,248	14,256	− 8	0,06
22	24,00	35,0–28,2	3,747	3,749	− 2	0,05

Da die absoluten Fehler nicht mit der Dauer der Versuche wachsen, muß der prozentuelle Fehler am kleinsten bei lang andauernden Versuchen sein. Es ist jedoch am beschwerlichsten gewesen, den Apparat während der langwierigen Versuche gut funktionierend zu erhalten, hauptsächlich infolge von technischen Schwierigkeiten, die trotzdem überwunden wurden. Aber die Schwierigkeiten zeigten, wie mißtrauisch man sein muß Resultaten von Stoffwechselversuchen gegenüber, die in nicht selbstkontrollierenden Apparaten ausgeführt werden, oder in Apparaten, die nicht häufig bei Kontrollversuchen untersucht wurden.

Es ist also mit sehr einfachen Mitteln gelungen, einen Respirationsapparat für kleine Tiere zu bauen, in dem die Sauerstoffaufnahme, Kohlensäureabgabe und die Wasserausscheidung gemessen werden können, sowie auch die Ausscheidung von verbrennbaren Luftarten; außerdem kann Futter, Exkremente und Urin gesammelt und untersucht werden. Der Apparat gestattet, die Dauer der Versuche zu variieren, auf

[1]) Die beiden Zahlen geben das Gewicht der Ratte bei Beginn und am Ende des Versuches an.

alle Fälle zwischen 3 und 24 Stunden und auch die Versuchsbedingungen auf viele Weise zu variieren, so z. B. die Zusammensetzung der Luft, in der sich das Versuchstier aufhält. Außerdem kann die Sauerstoffaufnahme des Versuchstieres in kurzen Perioden während des Versuches bestimmt werden. Aber vor allem ist der Apparat selbstkontrollierend auf eine sehr effektive Weise, ohne weder so kostspielig, noch so kompliziert, noch so schwierig zu bedienen zu sein wie ein Respirationscalorimeter, während er doch mit einer sehr großen Genauigkeit arbeitet.

Zusammenfassung.

Durch Kombination der Haldaneschen Respirationsapparattype mit der Regnault-Reisetschen (ungefähr in der von Benedict benutzten Form) ist mit einfachen Mitteln ein Respirationsapparat für kleine Tiere konstruiert worden, in dem der Sauerstoffverbrauch des Versuchstieres auf zwei voneinander unabhängigen Wegen bestimmt wird (direkt und indirekt). Der Apparat wird hierdurch selbstkontrollierend wie die Respirationscalorimeter in einer früher nicht beschriebenen Weise. Außer zwei Reihen von Kontrollversuchen, eine über die Wasser- und eine über die Kohlensäurebestimmung in dem Apparat, ist eine Reihe von 13 Tierversuchen von $2^1/_2$ bis 24 Stunden Dauer mit dem Apparat ausgeführt worden, in welchen Versuchen die beiden Bestimmungen des Sauerstoffverbrauches innerhalb $0,5\,^0/_0$ miteinander übereinstimmten, sofern die Versuchsdauer mehr als $3^1/_2$ Stunden war.

Anhang.

Protokoll über Versuch 22 (den 9. I. bis 10. I. 1913).
Versuchstier: Junge, männliche Ratte. — Fütterung: Inanition.
Gewicht der Ratte vor dem Versuch: 35,0 g,
" " " nach " " : 28,2 g.

	Gewicht der Tierbehälter g	Wasser-Absorptionsflasche *A* g	Kohlensäure-Absorptionsapparat g	Wasser-Absorptionsflasche *C* g
Vor dem Versuch .	1171,467	568,488	1384,699	456,108
Nach dem Versuch	1166,580	573,355	1382,269	462,307
	− 4,887	+ 4,867	− 2,430	+ 6,199

Kohlensäureabgabe:

$$6{,}199 - 2{,}430 = 3{,}769 \text{ g}.$$

Sauerstoffaufnahme (indirekt bestimmt):

$$3{,}769 + 4{,}867 - 4{,}887 = 3{,}749 \text{ g}.$$

	Spirometerablesung	Apparatthermometer				Spirometermanometer	Apparatmanometer	Barometer
		1	2	3	4			
	mm	Grad	Grad	Grad	Grad	mm	mm	mm
Am 9. I. 3^h 20′	573,5	20,0	19,9	20,1	20,7	15	35	776,0
„ 10. I. 3^h 20′	464,4	20,0	19,7	20,0	20,7	16	36	774,5

Korrektion der Anfangsspirometerablesung:

$$(573{,}5 + 25{,}4)\cdot 25{,}6 - 9472\left(\frac{764 - 776}{760} + \frac{20{,}2}{273}\right) = 14151 \text{ ccm}.$$

Korrektion der Schlußspirometerablesung:

$$(464{,}4 + 25{,}4)\cdot 25{,}6 - 9472\left(\frac{764 - 774{,}5}{760} + \frac{20{,}1}{273}\right) = 11539 \text{ ccm}.$$

Sauerstoffaufnahme (direkt bestimmt):

$$14151 - 11539 = 2612 + \text{Corr. } 12 = 2624 \text{ ccm} = 3{,}747 \text{ g}.$$

Analyse der Tierkammerluft.

Am 9. I. 3^h20′: 0,38 % Kohlensäure, 20,91 % Sauerstoff, 0 % brennbare Luft.
„ 10. I. 3^h20′: 0,39 % „ , 21,82 % „ , 0 % „ „

Reinigung von Invertasepräparaten durch Behandlung mit Säuren.

(I. Mitteilung über Invertase.)

Von

J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 30. Juni 1913.)

Als Ausgangsmaterial für die folgenden Versuche über Invertase diente der Buchnersche Hefepreßsaft. Die üblichen Methoden zur Isolierung dieses Enzyms beruhen auf der Darstellung von wässerigen Hefeauszügen oder von Autolysesäften; d. h. durch Trocknen oder durch Behandlung mit Alkohol, Chloroform usw., geschwächte oder getötete Hefe wird längere Zeit mit Wasser ausgezogen oder auch ohne Zugabe von Wasser direkt der Autolyse überlassen [C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1]), E. Salkowski[2]), H. Euler[3]) u. a.]. Das Preßsaftverfahren, das bereits von E. Buchner und W. Antoni[4]), sowie von A. Wróblewski[5]) zu einigen Versuchen benutzt worden ist, hat vor den anderen Methoden den Vorzug großer Schnelligkeit und hoher Enzymausbeuten.

Bekanntlich enthält der Hefepreßsaft die Zellinhaltsstoffe der Hauptsache nach unverändert; damit bot sich die Möglichkeit, die unabgebauten hochmolekularen Eiweißkörper auf sehr einfachem Wege, nämlich durch Säurezusatz, auszufällen. Das

---

[1]) Journ. Chem. Soc. **57**, 834, 1890.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 307, 1900/01; **61**, 124, 1909.

[3]) H. Euler, E. Lindberg und K. Melander, ebenda **69**, 152, 1910.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**, 206, 1905.

[5]) Journ. für prakt. Chem. **64**, 27, 1901.

Verfahren schien von vornherein aussichtsvoll, weil die Invertase gegen Säure nicht sehr empfindlich ist. Versuche nach dieser Richtung hat bereits A. Wróblewski in seiner oben erwähnten Arbeit angestellt. Er zeigte, daß die durch Behandeln mit Essigsäure erhaltenen Eiweißfällungen nur wenig Invertase enthalten und daß die abfiltrierten Lösungen ein ungeschwächtes oder etwas stärkeres Invertierungsvermögen besitzen als vorher.

Wir haben nun festgestellt, daß sich auf diesem Wege der Vorfällung mit Säuren eine sehr erhebliche Verbesserung der Invertasepräparate (bis zum doppelten des ursprünglichen Wertes) erreichen läßt. Und zwar gelang dies nicht nur mit Essigsäure, die nach unseren Erfahrungen gar nicht besonders günstig wirkt, sondern noch viel besser mit Salzsäure und am besten meist mit den zweibasischen Säuren Schwefelsäure und Oxalsäure. Alle diese Säuren geben mit frischen Hefepreßsäften Niederschläge[1]); zur Erzielung der günstigsten Wirkung sind, abgesehen von konstitutiven Einflüssen, wie zu erwarten, je nach dem Dissoziationsgrad wechselnde[2]) Mengen nötig. Da die Invertase durch stärkere Säurekonzentrationen zerstört wird, so besteht für jede Säure eine bestimmte Grenzkonzentration, oberhalb welcher Schädigung des Enzyms eintritt. So wurde z. B. bei Anwendung von 60 ccm $^{n}/_{10}$-Salzsäure auf 100 ccm Preßsaft eine erheblich stärkere Verbesserung erreicht als mit 80 ccm (Vers. XI). Genaue Angaben, wieviel Säure in jedem einzelnen Falle zugesetzt werden muß, lassen sich nicht machen, da dies von der Beschaffenheit der Hefe abhängt. Zweckmäßig ist es, durch einen Vorversuch die optimale Säuremenge zu ermitteln, wobei der Umstand sehr zustatten kommt, daß die fällbaren Eiweißstoffe schon vor Erreichung des Grenzpunktes fast völlig niederfallen und daß so für den Zusatz von Säure ein gewisser Spielraum bleibt. Die Menge der Eiweißniederschläge beträgt etwa $^1/_3$ bis $^1/_2$ der Trockensubstanz; dementsprechend steigt die Wirkung des aus dem Filtrat durch Ausfällen mit Aceton gewonnenen Invertasepräparats um 50

---

[1]) E. u. H. Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung 1903, S. 72.

[2]) Vgl. S. P. L. Sörensen und E. Jürgensen, diese Zeitschr. 31, 397, 1911 und L. Michaelis und H. Davidsohn, ebenda 33, 469, 1911.

bis 100%. Die Eiweißniederschläge sind stets so gut wie invertasefrei. Daraus ergibt sich der große Vorteil des Verfahrens: Fortschaffung großer Mengen indifferenter Verunreinigungen ohne jeglichen Enzymverlust.

Völlige Entfernung der Eiweißstoffe läßt sich auf diesem Wege natürlich nicht erzielen. Aber man kann nunmehr mit Erfolg die andern bisher zur Reinigung der Invertase benutzten Verfahren, wie z. B. fraktionierte Fällung mit Alkohol[1]), Dialyse[2]), Enteiweißung mit Kaolin[3]) usf. heranziehen. Nach den wenigen in dieser Hinsicht von uns bisher angestellten Versuchen ist das angedeutete Verfahren ein aussichtsvoller Weg zur weiteren Reinigung der Invertase.

Bei allen derartigen Versuchen zur Darstellung aktiverer Invertasepräparate (vgl. auch die folgende Mitteilung) ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß neben der Vermehrung des eigentlichen Enzyms auch Verstärkung eines etwaigen Koenzyms oder Schwächung eines Hemmungskörpers erfolgen kann[4]). Wenn auch die Existenz einer Verbindung der letzteren Art durch eine kürzlich erschienene Arbeit von A. Eriksson[5]) bewiesen sein dürfte, so erscheint es uns doch nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen und nach eigenem Erfahrungen äußerst unwahrscheinlich, daß derartige Einflüsse hier irgendwie wesentlich das Bild trüben können.

Experimenteller Teil.

Zur Herstellung der Preßsäfte — nach dem Buchnerschen Verfahren — diente in der Regel untergärige Hefe der hiesigen Schultheißbrauerei, der wir für die freundliche Überlassung zu Dank verpflichtet sind. In einigen besonders angemerkten Fällen wurde statt dessen die käufliche Münchner Bierhefe verwandt. Aus den Preßsäften wurden die Invertasepräparate durch Eintragen in das 10 bis 12fache Volumen Aceton und

---

[1]) C. O'Sullivan und F. W. Tompson, a. a. O.

[2]) K. A. Osborne, Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 399, 1899 u. a.

[3]) L. Michaelis, diese Zeitschr. 7, 489, 1907. — H. Euler und S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 73, 335, 1911.

[4]) Vgl. H. Euler und B. af Ugglas, Zeitschr. f. physiol. Chem. 70, 279, 1911.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 72, 313, 1911.

darauffolgendes gutes Auswaschen mit absolutem Alkohol und Äther gewonnen. An Stelle des Acetons empfiehlt es sich bei durch längeres Stehen schon autolysierten Säften, die im übrigen die Invertase ungeschwächt enthalten, absoluten Alkohol als Fällungsmittel zu nehmen, weil in solchen Fällen mit Aceton schmierige, schlecht absitzende und schwer filtrierbare Niederschläge entstehen.

Zur Untersuchung wurden 0,020 g bzw. 0,040 g abgewogen und in 100 ccm Wasser gelöst. Hiervon wurden 10 ccm 4 bis 5 Stunden lang mit einer ca. 5 %igen Rohrzuckerlösung in Berührung gelassen (Temperatur bei den ersten Versuchen 37°, später 20°). Zur Erzielung der Optimalwirkung der Invertase war der Zuckerlösung etwas Säure zugesetzt: 750 ccm enthielten 20 ccm $^{n}/_{100}$-Salzsäure[1]). Nach der angegebenen Zeit wurde Enzymwirkung und Mutarotation durch Zugabe von 4 ccm $^{n}/_{5}$-Natriumcarbonatlösung aufgehoben, meist auf 75 ccm verdünnt und bei 20° polarisiert (Methode A).

Da sich hierbei, wie colorimetrische Messungen mit Indicatoren nach S. P. L. Sörensen[2]) zeigten, häufig erhebliche Schwankungen in der H-Ionenkonzentration, je nach der Beschaffenheit der ursprünglichen Hefe, ergeben, wurde zuletzt bei Gegenwart von 1 % primärem Natriumphosphat (als „Puffer") gearbeitet. Abbruch mit 4 ccm 2 n-Natronlauge. Die Lösungen wurden unverdünnt polarisiert (Methode B).

Als Maß für die Aktivität der Präparate dienten die mit dekadischen Logarithmen berechneten Geschwindigkeitskonstanten $K = \frac{1}{t} \ln \frac{a}{a-x}$. Die Enddrehung der invertierten Zuckerlösungen ist aus der Anfangsdrehung durch Multiplikation mit dem Faktor 0,32 berechnet.

In den folgenden Tabellen bedeuten: E die angewandte Invertasemenge in Gramm, t die Inversionsdauer, α den abgelesenen Drehungswinkel.

Zunächst seien einige Versuche mit Oxalsäure angeführt:

[1]) Nach Kjeldahl (Meddelelser fra Carlsberg Labor. 1, 337, 1881) beträgt die optimale Schwefelsäuremenge etwa 5 ccm $^{n}/_{100}$-Schwefelsäure für ein Volumen von 100 ccm.

[2]) Diese Zeitschr. 21, 131, 1909.

I.

50 ccm Preßsaft aus Münchner Hefe. Inversion bei 36°. Methode A. Oktober 1910.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,41	—	—
—	—	∞	358,59	—	—
Contr.	0,001	300	3,83	16	—
"	0,002	300	3,35	29	—
4 ccm Oxalsäure[1])	0,001	300	3,73	18	13
4 " "	0,002	300	3,16	35	21
8 " "	0,001	300	3,72	18	13
8 " "	0,002	300	2,82	46	59

II.

Bei folgendem Versuch mit je 50 ccm Preßsaft aus Münchner Hefe wurde die Inversion sowohl bei 36° als auch bei 20° vorgenommen (November 1910). Methode A.

a) bei 36°.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,38	—	—
—	—	∞	358,60	—	—
Contr.	0,001	300	2,09	73	—
"	0,002	300	0,29	178	—
4 ccm Oxalsäure[1])	0,001	300	1,46	102	40
4 " "	0,002	300	359,72	238	34

b) bei 20°.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
Contr.	0,001	300	3,12	36	—
"	0,002	300	2,24	67	—
4 ccm Oxalsäure[1])	0,001	300	2,75	48	33
4 " "	0,002	300	1,71	90	34

Ähnliche Verbesserungen wurden auch mit Salzsäure und Schwefelsäure erhalten, etwas weniger günstige mit Essigsäure:

[1]) 0,92 normal.

III.

50 ccm Preßsaft aus Münchner Hefe. Inversion bei 20,5°. Methode A. Juli 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,30	—	—
—	—	∞	358,62	—	—
Contr.	0,004	248	1,56	115	—
20 ccm $^n/_{10}$-HCl	0,004	244	1,56	117	1,7
27 „ „	0,004	246	1,35	129	12,0
33 „ „	0,004	243	1,33	132	15,0
40 „ „	0,004	242	1,18	143	24,0
47 „ „	0,004	242	0,96	159	38,0

Einige von diesen Präparaten wurden auch nach Methode B untersucht; hierbei kam die Verbesserung noch stärker zum Ausdruck:

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,87	—	—
—	—	∞	358,44	—	—
Contr.	0,004	254	2,39	83	—
20 ccm $^n/_{10}$-HCl	0,004	254	2,18	93	12
33 „ „	0,004	253	1,76	113	36
47 „ „	0,004	253	1,35	136	64

IV.

Je 50 ccm Preßsaft aus Münchner Hefe (8 Tage lang unter Eis aufbewahrt). Inversion bei 20°. Methode B. August 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,55	—	—
—	—	∞	358,54	—	—
Contr.	0,004	250	2,26	84	—
75 ccm HCl, enthaltend:					
50 ccm $^n/_{10}$-HCl	0,004	250	1,41	128	53
60 „ „	0,004	249	1,22	144	71
70 „ „	0,004	249	1,34	133	59
75 „ „	0,004	248	1,42	129	54

V.

Je 50 ccm Preßsaft (2 Tage alt). Die Alkoholfällungen wurden erst 4 Tage nach dem Säurezusatz vorgenommen. Inversion bei 20,5°. Methode B. Dezember 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,81	—	—
—	—	∞	358,46	—	—
Contr.	0,004	241	3,12	56	—
5 ccm $^n/_2$-H_2SO_4	0,004	241	2,24	94	68
7,5 „ „	0,004	241	2,19	96	72
10,0 „ „	0,004	240	2,59	78	39
12,5 „ „	0,004	239	2,30	92	64
15,0 „ „	0,004	239	2,58	79	41

VI.

Je 50 ccm Preßsaft (2 Tage alt). Inversion bei 20,5°. Methode A. Juli 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,39	—	—
—	—	∞	358,60	—	—
Contr.	0,004	240	3,05	48	—
30 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4	0,004	240	2,65	65	35
40 „ „	0,004	240	2,63	66	38
50 „ „	0,004	240	2,57	68	42
60 „ „	0,004	248	2,63	64	33

VII.

Je 50 ccm Preßsaft. Inversion bei 20°. Methode B. Nov. 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,80	—	—
—	—	∞	358,46	—	—
Contr.	0,004	251	3,19	51	—
2,5 ccm 13%ige Essigs.	0,004	250	3,01	58	14
5,0 „ „ „	0,004	250	3,03	57	12
10,0 „ „ „	0,004	248	2,99	59	16

Im folgenden sind einige vergleichende Versuche über die Wirkung der einzelnen Säuren angeführt:

VIII.

Je 50 ccm Preßsaft. Inversion bei 24°. Methode A. Juli 1911.

Vorfällung mit	*E*	*t*	*α*	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,40	—	—
—	—	∞	358,59	—	—
Contr.	0,002	300	2,83	46	—
	0,004	300	1,96	79	—
4 ccm Oxalsäure [1]	0,002	300	2,57	55	20
4 „ „	0,004	300	1,10	121	58
10 „ „	0,002	300	2,53	56	22
10 „ „	0,004	300	1,10	121	53
5 „ Essigsäure [1]	0,002	300	2,47	59	28
5 „ „	0,004	300	1,45	103	30
10 „ „	0,002	300	2,28	66	43
10 „ „	0,004	300	1,15	119	51
30 „ „	0,002	300	2,40	61	33
30 „ „	0,004	300	1,13	120	52
50 „ n/10-HCl	0,002	300	2,40	61	33
50 „ „	0,004	300	0,94	131	66
Contr.	0,002	300	2,91	43	—
„	0,004	300	1,61	95	—
6 ccm Oxalsäure [1]	0,002	300	2,53	56	30
6 „ „	0,004	300	1,05	124	31
50 „ n/10-HCl	0,002	300	2,50	57	33
50 „ „	0,004	300	1,04	125	32
100 „ „	0,002	300	4,31	2,3	— 96
100 „ „	0,004	300	4,28	3	— 97

IX.

Je 5 g einer 1 Monat alten Acetonfällung in je 74 ccm Wasser gelöst und wie folgt verarbeitet. Inversion bei 20°. Methode A. Mai 1912.

Vorfällung mit	*E*	*t*	*α*	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,41	—	—
—	—	∞	358,59	—	—
Contr.	0,004	240	3,04	49	—
36 ccm n/10-HCl	0,004	240	2,78	60	23
36 „ n/10-H_2SO_4	0,004	240	2,70	63	29
36 „ „ [2]	0,004	240	2,67	65	33
54 „ „	0,004	240	2,78	60	23

[1]) 0,92 normal.

[2]) 24 Stunden in Berührung mit der Säure.

X.

50 ccm Preßsaft (1 Tag alt). Inversion bei 20°. Methode A. Mai 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	5,03	—	—
—	—	∞	358,39	—	—
Contr.	0,004	240	3,85	35	—
2 ccm Oxalsäure [1])	0,004	240	3,63	43	23
2 „ „ [2])	0,004	240	3,50	48	37
40 „ $^n/_{10}$-H_2SO_4	0,004	240	3,72	40	14
50 „ „	0,004	240	4,02	30	—14

Bei diesem Versuch wurden die Eiweißniederschläge und die Acetonfällungen gewogen. 50 ccm des ursprünglichen Saftes gaben 2,2 g Acetonfällung. Das ausgeflockte abzentrifugierte Eiweiß wog 0,4 bis 0,5 g, die davon abgetrennten Säfte lieferten (nach der Größe der unvermeidlichen Arbeitsverluste etwas wechselnd) 1,2 bis 1,5 g Invertasepräparat.

Wie zu erwarten war, wirkten die Säuren proportional dem Grade ihrer Ionisation auf die Preßsäfte ein:

XI.

50 g eines 3 Monate alten Invertasepräparates wurden in 550 ccm Wasser gelöst. Dabei blieb eine geringe Menge inaktiver Substanz ungelöst; dementsprechend stieg die Wirkung der Acetonfällung aus dem Filtrat etwas an ($K \cdot 10^5$ von 37 auf 43). Portionen von je 50 ccm wurden in der üblichen Weise verarbeitet. Inversion bei 20°. Methode A. Oktober 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,30	—	—
—	—	∞	358,62	—	—
Contr.	0,004	232	3,14	43	—
30 ccm $^n/_{10}$-HCl	0,004	231	2,51	71	65
40 „ „	0,004	231	2,91	53	23
50 „ „	0,004	230	3,19	41	— 5
60 „ „	0,004	240	3,74	19	—56
—	—	0	4,87	—	—
—	—	∞	358,44	—	—
60 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4	0,004	231	3,32	52	21
75 „ „	0,004	242	3,80	33	—23
90 „ „	0,004	240	4,48	11	—75

[1]) Kaltgesättigt (1,65 normal).
[2]) 6,5 Stunden in Berührung mit der Säure.

Die Versuche in Tabelle III, IV, V und VI zeigen deutlich das langsame An- und Abschwellen der Verbesserung mit steigender Säuremenge. Versuche VIII, X und XI beweisen zugleich, daß überschüssige Säure schädlich wirkt. Dies geht auch aus folgenden Versuchen hervor:

XII.

50 ccm Preßsaft. Inversion bei 20,5°. Methode A. Juli 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,43	—	—
—	—	∞	358,58	—	—
Contr.	0,004	252	3,16	42	—
54 ccm $^n/_{10}$-HCl	0,004	250	3,07	46	9,5
80 „ „	0,004	250	4,41	6	−86
—	—	0	5,03	—	—
—	—	∞	358,39	—	—
Contr.	0,002	240	3,94	32	—
40 ccm $^n/_{10}$-HCl	0,002	240	4,33	20	−38
50 „ „	0,002	240	5,00	8	−75
—	—	0	4,37	—	—
—	—	∞	358,60	—	—
Contr.[1])	0,004	240	2,38	77	—
5 ccm Oxalsäure[2])	0,004	240	2,55	69	−10
10 „ „	0,004	240	3,87	16	−79
15 „ „	0,004	240	4,36	3	−96
—	—	0	4,66	—	—
—	—	∞	358,51	—	—
Contr.	0,004	240	3,53	37	—
10 ccm Oxalsäure enthaltend:					
5 ccm gesätt. Säure[2])	0,004	240	3,18	50	35
7,5 „ „ „	0,004	240	3,58	35	− 6
10 „ „ „	0,004	240	4,32	9,8	−73

Säuremengen, die in anderen Fällen noch eine beträchtliche Verbesserung gegeben hatten, waren bei den obigen Versuchen schon schädlich gewesen. Die Abhängigkeit der Größe des Erfolges von der Qualität der Hefe illustrieren folgende Versuche:

---

[1]) Preßsaft aus Münchner Hefe.

[2]) 1,65 normal.

XIII.

50 ccm Preßsaft aus Melassehefe. Inversion bei 36°. Methode A. April 1911.

Vorfällung mit	*E*	*t*	*α*	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,50	—	—
—	—	∞	358,56	—	—
Contr.	0,002	300	3,78	18	—
„	0,004	300	3,21	35	—
7 ccm Oxalsäure [1])	0,002	300	2,81	48	166
7 „ „	0,004	300	1,52	101	188

XIV.

50 ccm Preßsaft. Inversion bei 20°. Methode A. Dezember 1911.

Vorfällung mit	*E*	*t*	*α*	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,41	—	—
—	—	∞	358,59	—	—
Contr.	0,002	240	3,81	19,7	—
15 ccm H_2SO_4, enthaltend:					
3 ccm $^n/_2$-H_2SO_4	0,002	240	3,70	23,5	19,3
5 „ „	0,002	240	3,71	23,2	17,8
7,5 „ „	0,002	240	3,65	25,3	29,4
10 „ „	0,002	240	3,75	21,3	8,1
15 „ „	0,002	240	3,73	22,4	13,7

Auch Preßsäfte, bei denen durch Stehenlassen schon ziemlich starke Selbstverdauung eingetreten war, gaben nach der Vorbehandlung mit Säuren aktivere Präparate bei der Acetonfällung. Als Beispiele seien folgende Versuche angeführt:

XV.

50 ccm Preßsaft (2 Tage alt). Die einzelnen Portionen waren vor dem Abzentrifugieren der Eiweißniederschläge je 2 Tage in Berührung mit der Säure. Ausfällung der vorbehandelten Lösungen wegen der durch die Säure beschleunigten Autolyse mit Alkohol. Inversion bei 20°. Methode B. Oktober 1912.

Vorfällung mit	*E*	*t*	*α*	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,76	—	—
—	—	∞	358,48	—	—
Contr.	0,004	244	3,21	50	—

[1]) 1,65 normal.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
15 ccm Oxalsäure, enthaltend:					
4 ccm 0,82 n-Säure	0,004	242	2,28	90	80
5 „ 0,82 „	0,004	241	2,05	102	104
8 „ 0,82 „ [1])	0,004	239	2,08	102	104

Allerdings gaben autolysierte Preßsäfte auch an sich beim Fällen mit Alkohol aktivere Invertasepräparate:

Vorbehandlung	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
Urspr. Pr.	0,004	244	3,21	50	—
Nach 8 Tagen	0,004	244	2,39	85	70

Doch liegen auch Versuche vor, in denen der Invertasegehalt der aus älteren Preßsäften erhaltenen Acetonfällungen konstant geblieben war.

Für die Methodik ist die zum Teil schon aus obigen Versuchen hervorgehende Tatsache wichtig, daß längere Berührung der Säfte mit der Säure der Invertase nicht oder nur wenig schadet:

XVI.

Je 50 ccm Preßsaft (1 Tag alt) wurden mit Oxalsäure gefällt, sofort abzentrifugiert und die angegebenen Zeiten bei 26° aufbewahrt. Inversion bei 20°. Methode B. November 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,80	—	—
—	—	∞	358,46	—	—
Contr.	0,004	251	3,19	51	—
5 ccm 0,82 n-Oxalsäure:					
Nach 1 Tag	0,004	248	2,17	94	84
„ 2 Tagen	0,004	247	2,35	86	68
„ 3 „ [2])	0,004	251	2,30	87	71

[1]) 3 Tage in Berührung mit der Säure gelassen.

[2]) Die Lösung koagulierte beim Erwärmen nicht mehr und gab keine Fällung mit Oxalsäure.

In folgendem orientierenden Versuch ist unsere Methode der Säurefällung mit der von L. Michaelis eingeführten, auch von H. Euler mit Erfolg benutzten Kaolinmethode an demselben Preßsaft miteinander verglichen:

XVII.

a)

Fällung mit Oxalsäure. Je 50 ccm 4 Tage alter Preßsaft. Inversion bei 20°. Methode B. Dezember 1912.

Vorfällung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,86	—	—
—	—	∞	358,44	—	—
Contr.	0,004	257	2,77	67	—
12,5 ccm Oxalsäure, enthaltend:					
3 ccm 0,82 n-Säure	0,004	257	2,11	95	42
5 „ 0,82 „	0,004	256	1,72	114	70
5 „[1]) 0,82 „	0,004	256	1,47	127	(90)
7,5 „ 0,82 „	0,004	252	1,71	116	73
10 „ 0,82 „	0,004	252	1,46	130	94
12,5 „ 0,82 „	0,004	251	3,18	53	—21

b)

Kaolinreinigung: 80 ccm Preßsaft wurden mit 20 g Kaolin einen Tag stehen gelassen (I.). Nach dem Zentrifugieren (erh. 63 ccm) wurden 33 ccm mit 15 g Kaolin noch 2 Tage behandelt (II.).

	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
I.	0,004	250	2,58	76	13
II.	0,004	250	2,27	90	34

In diesem Falle hatte die Reinigung mit Säuren ein weit besseres Ergebnis als die mit Kaolin.

Sehr aussichtsvoll scheint es zu sein, die Kaolinmethode an die Säurereinigung anzuschließen; dabei wurden recht bemerkenswerte Verbesserungen erreicht:

[1]) Der Versuch wurde erst 24 Stunden nach dem Säurezusatz abzentrifugiert und weiter verarbeitet.

XVIII.[1])

Je 35 ccm der von den Eiweißniederschlägen abzentrifugierten Lösungen wurden mit je 20 g Kaolin über Nacht stehen gelassen. Inversion bei 20°. Methode B. Oktober 1912.

Vorbehandlung mit	E	t	α	$K \cdot 10^5$	Verbesserung %
—	—	0	4,76	—	—
—	—	∞	358,48	—	—
Contr.	0,004	244	3,21	50	—
4 ccm Oxalsäure	0,004	242	2,28	90	80
4 „ „ + Kaolin	0,004	241	1,76	117	134
5 „ „	0,004	241	2,05	102	104
5 „ „ + Kaolin	0,004	241	1,45	145	190

[1]) Die Oxalsäureversuche sind die gleichen wie in Tabelle XV. Aus diesen geht auch hervor, daß die nach der Säuremethode allein erreichbare Verbesserung mit 5 ccm Oxalsäure erzielt war.

Anreicherung des Invertasegehalts lebender Hefe.

II. Mitteilung über Invertase.

Von

J. Meisenheimer, St. Gambarjan und L. Semper.

(Aus dem chemischen Laboratorium der Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 30. Juni 1913.)

Wie aus der vorigen Mitteilung hervorgeht, ist der Invertasegehalt lebender Hefe auch bei derselben Rasse ein sehr wechselnder. Er hängt offenbar von dem „physiologischen Zustand“ der Hefe ab und sollte sich durch äußere Bedingungen beeinflussen und eventuell erhöhen lassen. Am nächsten liegt der Gedanke, die Hefe durch Behandlung mit Rohrzuckerlösung zu einer vermehrten Invertaseproduktion anzuregen. Der Versuch bot um so mehr Aussicht, als die verwendete Bierhefe seit tausenden und mehr Generationen auf Maltoselösungen gewachsen ist, einem Nährmedium, auf dem sie ihre Invertase gar nicht gebraucht. Gegen diese Ansicht sprechen aber die Erfahrungen von A. Fernbach[1]), der fand, daß es für den Invertasegehalt der Hefe ziemlich gleich bleibt, ob sie auf Maltose- oder Rohrzuckerlösungen herangewachsen ist. Trotzdem haben wir die Versuche unter etwas veränderten Bedingungen wieder aufgenommen.

Fast gleichzeitig und unabhängig von uns haben H. Euler und seine Mitarbeiter[2]) sich mit demselben Problem der Inver-

---

[1]) Ann. de l'Inst. Pasteur **4**, 641, 1890.

[2]) H. Euler und B. af Ugglas, Zeitschr. f. physiol. Chemie **70**, 279, 1910. Durch diese Mitteilung wurden wir auf eine frühere Arbeit derselben Autoren aufmerksam (Arkiv för Kemi **3**, Nr. 34, 1910, Chem. Zentralbl. **1910**, 2, 1550), in der sie auch bereits über den Einfluß von Zucker auf den Invertasegehalt der Hefe einen Versuch angestellt haben.

taseanreicherung beschäftigt. In Verfolgung eines anderen Gedankenganges versuchten sie, durch Behandlung mit Phosphatlösungen eine erhöhte Invertaseproduktion der Hefe hervorzurufen und erreichten einen besonders günstigen Erfolg bei gleichzeitiger Anwesenheit von 2% Rohrzucker. Spätere Versuche[1]) mit anderer Hefe bestätigten dieses Resultat jedoch nicht.

Mittlerweile hatten uns unsere Versuche mit reinen Rohrzuckerlösungen gezeigt, daß die Anreicherung wesentlich auf den Zucker zurückgeführt werden muß. Wir trugen größere Mengen abgepreßter Bierhefe (1 bis 10 kg) in die 5 bis 10 fache Menge 10 bis 20%iger Rohrzuckerlösung ein, unterbrachen nach 1 bis 2 Tagen die Gärung durch Einwerfen von Eis und dekantierten von der nach einigen Stunden abgesetzten Hefe ab. Ein Teil davon wurde auf Preßsaft und Acetonfällung[2]) verarbeitet, zum Rest von neuem die entsprechende Menge Zuckerlösung gefügt und so fort, bis der Versuch durch die Hefeverluste — teils durch Entnahme der Proben, teils durch Selbstverzehrung[3]) — sein natürliches Ende fand. Die Anreicherung — immer gemessen an der Aktivität der Acetonfällungen — war bei den ersten „Führungen“ am stärksten, setzte dann wohl auch manchmal aus, um beim nächsten Mal wieder anzusteigen. Der günstigste Versuch zeigte eine Vermehrung der Invertasemenge auf mehr als das 8 fache.

So gute Resultate wurden allerdings nur bei einem verhältnismäßig geringen Anfangsgehalt der Hefe an Invertase erhalten. Das erinnert an die Erfahrungen von E. Buchner und F. Klatte[4]) bei der Zymase, deren Menge sich auch nur bei relativ gärschwachen Hefen in erheblichem Maße steigern ließ. Ein wesentlicher Unterschied zwischen Zymase und Invertase besteht aber darin, daß die Invertase, wie wir an zwei verschiedenen Unterhefen festgestellt haben, sich weit über das normale Maß hinaus vermehren läßt. Doch scheint auch hier eine obere Grenze zu existieren.

---

[1]) H. Euler und S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 17, 1911.

[2]) Siehe die voranstehende Mitteilung.

[3]) Vgl. den experimentellen Teil, sowie H. Euler und H. Meyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 283, 1912.

[4]) Diese Zeitschr. 9, 424, 1908.

Zu der Auffassung, daß der Zucker eine wesentliche Rolle bei der Enzymvermehrung spielt, ist später auch H. Euler in Gemeinschaft mit D. Johansson[1]) und H. Meyer[2]) gekommen. Ihre Versuchsanordnung weicht von der unsrigen vor allem dadurch ab, daß sie mit einer, neben Rohrzucker (2%) noch Stickstoff- und Phosphorsäure enthaltenden (sog. Lindnerschen) Nährlösung arbeiteten. Sie ließen die Hefe damit längere Zeit in Berührung, entnahmen ab und zu Proben und prüften deren Inversionskraft, indem sie, unter Verzicht auf die Isolierung von Invertasepräparaten, die lebende Hefe direkt[3]), mit oder ohne Chloroformzusatz, auf Rohrzucker zur Einwirkung brachten. Auf diese Weise erzielten sie nach 3 bis 4 Tagen eine Steigerung des Enzymgehaltes auf den 3 bis 4 fachen Wert. Einen bedeutend besseren Erfolg, eine Invertasevermehrung bis auf das 7 fache, erreichten H. Euler und H. Meyer[4]), indem sie, unserer oben geschilderten Versuchsanordnung analog, die Nährlösungen wiederholt erneuerten. Zugleich stellten sie fest, daß der Stickstoff- und der Phosphorsäuregehalt der Lösung nicht ausschlaggebend und daß auch reine Zuckerlösungen, wenn schon nicht so gut, für die Anreicherung geeignet sind.

Sehr bemerkenswert ist in diesen beiden Abhandlungen die Feststellung, daß bei den Anreicherungsversuchen der Rohrzucker durch Traubenzucker ersetzt werden kann. Wohl weiß man aus den Arbeiten von J. Wortmann[5]), A. Fernbach[6]), F. A. F. C. Went[7]) und anderen, daß die Bildung von Invertase bei Hefen und Schimmelpilzen nicht an die Gegenwart von Rohrzucker gebunden ist[8]), und dasselbe geht ja auch aus der

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 388, 1911/12.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 274, 1912.

[3]) Die Anwendbarkeit dieser Methode ist von C. O'Sullivan, Journ. Chem. Soc. 61, 926, 1892, A. Brown, ebenda, 81, 373, 1902, sowie H. Euler und S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 20, 1911, festgestellt worden.

[4]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 289, 1912.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 325, 1882.

[6]) Ann. de l'Instit. Pasteur 4, 641, 1890.

[7]) Pringsheims Jahrb. f. Botanik 36, 641, 1901.

[8]) So erzeugt auch der tierische Organismus nicht nur nach Injektion von Rohrzucker, sondern auch von Milchzucker oder Stärke im Plasma bzw. im Serum Invertase. E. Abderhalden und C. Brahm, Zeitschr. f. physiol. Chem. 64, 429, 1910; derselbe und G. Kapfberger, ebenda, 69, 23, 1910.

schon eingangs erwähnten Tatsache hervor, daß die stets in Bierwürze, also einer Maltoselösung gewachsene Hefe Invertase sogar noch in reichlicher Menge enthält. Aber die von Euler festgestellte Tatsache, daß die Invertasevermehrung auf Glucoselösung annähernd so groß ist wie auf Rohrzucker, ist doch sehr überraschend.

Mit diesen Ergebnissen von Euler sowie den Erfahrungen der anderen Forscher auf dem gleichen Gebiete stimmt eine etwa vor Jahresfrist erschienene Untersuchung von L. Lichtwitz[1]) nicht überein, nach der auf Rohrzucker herangewachsene Hefe ein bedeutend stärkeres Inversionsvermögen besitzt als auf Invertzucker gezüchtete. Hieraus schließt Lichtwitz auf eine Lähmung der Invertase durch den Invertzucker, bzw. durch Glucose oder Fructose im Sinne von G. Tammann[2]), der zuerst ganz allgemein auf die Hemmung von Enzymvorgängen durch die Reaktionsprodukte hingewiesen hat. Doch weicht Lichtwitz darin von Tammann ab, daß er auf Grund seiner Versuche dieser „Fermentlähmung" eine bleibende, die Anwesenheit des Invertzuckers usw. überdauernde Wirkung zuschreibt.

Die Resultate von Lichtwitz schienen für die von uns behandelte Frage von solcher Bedeutung, daß wir unsere Anreicherungsversuche auf die Spaltprodukte des Rohrzuckers ausdehnten. Wenn man berücksichtigt, daß die Hefe den Rohrzucker unvergleichlich viel schneller invertiert als vergärt[3]), also bei den von uns verwendeten großen Mengen auch in den Rohrzuckerversuchen mit rasch wachsenden Mengen Invertzucker in Berührung war, so hätte man schon hier den von Lichtwitz behaupteten lähmenden Einfluß unbedingt beobachten müssen. Dies war nun niemals der Fall, und ebensowenig haben wir, als wir an Stelle von Rohrzucker von vornherein mit Invertzucker arbeiteten, die Beobachtungen von Lichtwitz bestätigen können. Ganz im Gegenteil erzielten wir hierbei eine etwa ebenso gute Vermehrung der Invertase wie

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 78, 129, 1912.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 16, 271, 1892.

[3]) Siehe Buchner-Hahn, Die Zymasegärung S. 77 und 96. Quantitative Messungen haben H. Euler und S. Kullberg angestellt, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 27, 1911.

mit Rohrzucker, ein Resultat, das sich den Ergebnissen Eulers mit der Glucose aufs beste anschließt. Wir haben dann, in der Versuchsanordnung von Euler, die Hefe auch mit Glucose allein zusammengebracht und haben hier ebenfalls eine Invertasevermehrung von fast derselben Größe wie mit Rohrzucker erreicht; auffällig war aber dabei, daß die erzielte Verbesserung um 10 bis 20% hinter der mit Rohr- oder Invertzucker erhaltenen zurückblieb. Die Zahlen sind so eindeutig, daß nicht daran zu zweifeln ist, daß der Invertzucker eine kräftigere Wirkung auf die Invertasebildung in der Hefe ausübt als Glucose. Damit stimmen auch von den Vergleichsversuchen Eulers mit Rohrzucker und Glucose zwei sehr gut überein, während allerdings der dritte die Glucose, wenn auch nur sehr unwesentlich, besser erscheinen läßt als den Rohrzucker. Dies alles macht wahrscheinlich, daß auf Fructose, der anderen Komponente des Invertzuckers, eine größere Enzymvermehrung stattfinden muß. Vergleichende Versuche haben dann ergeben, daß die Fructose in der Tat der Glucose stets erheblich an Wirkung überlegen ist und daß sie auch den Rohr- und Invertzucker meistens noch übertrifft.

Wenn wir nach einer Erklärung für die Invertaseanreicherung auf Zuckerlösungen suchen, so ist zunächst die Tatsache zu beachten, daß die Hefe bei der Behandlung teilweise Autolyse erleidet. Dies macht sich bei längerer Versuchsdauer dadurch schon leicht bemerkbar, daß die Hefe an Menge beträchtlich abnimmt, ein schleimiges Aussehen gewinnt und schließlich viele tote Zellen enthält (Versuch I, 12; II, 4). Durch die Autolyse werden die hochmolekularen Eiweißstoffe in diffundierbare Spaltstücke zerlegt, durch deren Weggang der Gehalt der Hefe an Invertase scheinbar zunimmt; bekanntlich[1]) ist diese gegen die Endotryptase sehr beständig und wie alle Enzyme schwer diffundierbar. Damit stimmt überein, daß die Hefe auch durch bloßes Lagern unter Wasser invertasereicher wird[2]) (Versuch I, 13). Doch ist die dabei erzielte Verbesserung nicht sehr groß und reicht nicht entfernt zur Deutung der großen Effekte mit Zuckerlösungen aus; wohl aber dürfte die

[1]) Siehe vorangehende Abhandlung (Versuch XV).

[2]) Vgl. auch H. Lange, Wochenschr. f. Brauerei 24, 446, 1907.

schwache Steigerung[1]), die auch nach Verbrauch der Zuckerlösung anhält, auf diesen Grund zurückzuführen sein (Versuch II, 2, 3).

Nun ist aus der Kinetik der Invertasewirkung bekannt, daß die Gegenwart der Reaktionsprodukte Glucose und Fructose die Wirkung der Invertase auf Rohrzuckerlösungen hemmt, und zwar ist die Verzögerung bei der Fructose größer als bei der Glucose. Dies wird allgemein auf die Bildung von Additionsverbindungen Enzym-Glucose und Enzym-Fructose zurückgeführt[2]), von denen die Fructoseverbindung die stabilere ist, d. h. bei der Reaktion: Fructose + Invertase $\rightleftarrows$ Fructose-Invertaseverbindung ist das Gleichgewicht etwas stärker nach rechts verschoben. Auf dem gleichen Grunde dürfte es auch beruhen, daß die Fructose eine stärker schützende Wirkung auf die Invertase ausübt als die Glucose (Hudson[3]). Berücksichtigt man, daß bei den Anreicherungsversuchen die Fructose ebenfalls die stärkere Wirkung hat, so drängt sich der Gedanke auf, daß auch bei diesen Vorgängen die Additionsverbindungen eine Rolle spielen. Man kann sich vorstellen, daß in der Hefe normalerweise eine begrenzte Menge Invertase vorhanden ist und daß das Plasma das Bestreben hat, diese Konzentration aufrechtzuerhalten. Tritt Zucker in die Zelle ein, so wird durch die Bildung einer Additionsverbindung ein Teil der Invertase gewissermaßen verankert und dadurch eine entsprechende Neubildung ausgelöst. Wegen der größeren Beständigkeit der Fructoseverbindung wird die Fructose diese Wirkung in stärkerem Maße ausüben als Glucose. Werden nach Erschöpfung der Zuckerlösung diese Verbindungen wieder gespalten, so wird die Monose vergoren und das Enzym bleibt in größerer Menge als vorher in der Zelle zurück. Bei Darbietung von neuer Zuckerlösung wiederholt sich das Spiel bis zu einer von der Natur der Hefe abhängigen Grenze. Hiernach müßte der Rohr-

---

[1]) Vgl. H. Euler und H. Meyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 292, 1912.

[2]) V. Henri, Compt. rend. 135, 916, 1902; A. Brown, Journ. Chem. Soc. 81, 373, 1902; E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 516, 1904; L. Michaelis und M. L. Menten, diese Zeitschr. 49, 334, 1913.

[3]) C. S. Hudson und H. S. Paine, Journ. Am. chem. Soc. 32, 988, 1910.

zucker, der nach L. Michaelis und M. L. Menten[1]) die größte Affinität zur Invertase besitzt, den stärksten stimulierenden Einfluß auf das Invertasebildungsvermögen der Hefe ausüben; daß dies nicht der Fall ist, rührt offenbar daher, daß die Rohrzucker-Invertaseverbindung außerordentlich schnell unter Bildung von Invertzucker zerfällt.

In diesem Zusammenhang ist ein Versuch von I. Katz[2]) von Wichtigkeit, der über die Anreicherung von Diastase in Schimmelpilzen gearbeitet hat. Er beobachtete bei Aspergillus niger eine besonders große Diastasevermehrung, als er seinen Nährlösungen Tannin zusetzte, und erklärt dies damit, daß das Tannin, das mit der Diastase eine wasserunlösliche Verbindung bildet, das Enzym ständig aus der Lösung entfernt und dadurch eine stärkere Nachbildung veranlaßt. — An Stelle der hier vorhandenen Diastase-Tanninverbindung tritt in unserem Falle die Additionsverbindung Invertase-Monose. Hier wie dort ist die Enzymvermehrung darauf zurückzuführen, daß, allerdings durch ganz verschiedene Ursachen, Teile des Enzyms dauernd abgeführt werden.

Unsere Betrachtungsweise setzt voraus, daß die Invertasenachbildung nach Störung des Gleichgewichts verhältnismäßig langsam erfolgt, weil sonst der günstigste Effekt schon bei einmaligem Lagern der Hefe unter der Zuckerlösung erreicht werden müßte, während in Wirklichkeit mehrfache Erneuerung des verbrauchten Zuckers nötig ist. Andererseits wird man folgern, daß innerhalb gewisser Grenzen höhere Zuckerkonzentrationen unter sonst gleichen Bedingungen schneller zum Ziele führen werden, was das Experiment bestätigt[3]) (Versuch I, 7 u. 9).

Wie man sieht, schließt sich der obige Erklärungsversuch den Tatsachen nach verschiedenen Richtungen hin gut an, und er hat außerdem den Vorteil, einer experimentellen Prüfung auch weiterhin zugänglich zu sein. Allerdings geht aus verschiedenen Angaben der Literatur (A. Fernbach[4]), H. Euler[5])

[1]) a. a. O.

[2]) Pringsheims Jahrb. f. wiss. Bot. 31, 613, 1898.

[3]) Sehr starke Zuckerlösungen wirken wieder weniger günstig, offenbar weil dann die Erscheinung der Plasmolyse störend eingreift (Versuch II, 6).

[4]) a. a. O.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 296, 1912.

und auch aus eigens angestellten Vergleichsversuchen deutlich hervor, daß außer dem Zuckergehalt noch andere Faktoren, ganz besonders die Stickstoffnahrung, für die Invertasebildung von großer Bedeutung sind: ein und dieselbe Hefe bildet beim Lagern und Gären in stickstoffhaltiger Nährlösung (Euler) reichlicher Invertase, als in reiner Zuckerlösung (unsere Versuchsanordnung). Der Vorteil der Zufuhr von Nährstoffen außer Zucker dürfte vor allem darin zu suchen sein, daß dadurch die Hefe länger in einem kräftigen Lebenszustande erhalten und vor Entartung geschützt bleibt, wie wir sie bei unseren Versuchen, bei denen sie hungern mußte, stets bald auftreten sahen. Insofern ist also ein günstiger physiologischer Zustand der Hefe für die Invertasevermehrung von großer Bedeutung. Aber es erscheint uns nicht angängig, ihm die ausschlaggebende Rolle hierbei zuzumessen, wie das H. Euler[1]) anfänglich tat. Dagegen spricht schon die geringe Vermehrung der Hefe und die bei längerer Versuchsdauer trotz gleichzeitiger Verbesserung des Invertasegehalts immer stärker einsetzende Autolyse. Wir haben diese Frage durch eine vergleichende Untersuchung über das Verhalten des Hauptenzyms der Hefe, der Zymase, noch deutlicher zu entscheiden versucht. Länger wiederholte Behandlung der Hefe mit Zuckerlösung drückt, wie wir fanden, ihren Zymasegehalt (gemessen an der Gärkraft der Preßsäfte fast auf Null herab, während der Invertasegehalt immer noch steigt. Wir haben uns davon überzeugt, daß hierbei wirklich die Zymase geschädigt wird, nicht etwa nur das Koenzym, das allerdings im Anfang besonders stark geschwächt wird. Denn auch durch Kochsaftzusatz haben wir in den Preßsäften aus den letzten Führungen die Gärkraft nicht mehr auf einen irgend ansehnlichen Betrag bringen können (Versuch I, 12). — In der Zwischenzeit ist Euler[2]) ebenfalls auf Grund von Gärkraftbestimmungen (ausgeführt mit lebender Hefe) von seiner ursprünglichen Ansicht wieder abgekommen.

Zum Schlusse müssen wir noch einmal auf die Arbeit von Lichtwitz[3]) zurückkommen.

[1]) H. Euler und H. Meyer, Zeitschr. f. physiol. Chem. 79, 297, 1912.
[2]) H. Euler u. D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 97, 1913.
[3]) a. a. O.

Lichtwitz zeigt zunächst, daß auf Invertzucker gewachsene Hefe ein schwächeres Invertierungsvermögen besitzt als auf Rohrzucker gewachsene, und schließt daraus auf eine Lähmung der Invertasewirkung. Im zweiten Teil seiner Arbeit kommt er zum selben Schluß auf Grund der höchst überraschenden Beobachtung, daß seine Hefe Gemische von Rohr- und Invertzucker langsamer vergärt als Rohr- oder Invertzucker für sich: Solange Invertzucker vorhanden ist, hemmt er die Invertase, und erst nach seiner völligen Vergärung setzt — und zwar durch die „überdauernde Fermentlähmung" verlangsamt — die Inversion (und damit die Vergärung) des Rohrzuckers ein.

Unsere oben angeführten Versuchsergebnisse beweisen mit Sicherheit, daß die von Lichtwitz gezogenen Schlußfolgerungen nicht richtig sind[1]); wenn die Hefe beim Lagern unter Rohrzucker- und unter Invertzuckerlösung ihren Invertasegehalt in ganz gleicher Weise erhöht, kann der Invertzucker unmöglich einen dauernden lähmenden Einfluß auf die Invertase, und zwar weder auf ihre Bildung noch auf ihre Wirkung, zur Folge haben. Es fragt sich nun, wie man den gänzlich anderen Verlauf der Versuche von Lichtwitz erklären soll. Vielleicht sind seine abweichenden Versuchsbedingungen die Ursache; er ließ seine Hefe stets in den Vergleichslösungen aus minimaler Aussaat heranwachsen, während wir unter Bedingungen gearbeitet haben, unter denen eine Vermehrung der Hefe in irgend größerem Umfange ausgeschlossen erscheint. Bis zu einem gewissen Grade könnte man hierfür einen Versuch von G. Grèzes[2]) anführen, der bei der Heranzüchtung des Aspergillus niger auf Rohr- und Invertzucker enthaltenden Nährmedien ebenfalls eine stärkere Invertasebildung auf der Rohrzuckerlösung beobachtet hat; aber der Unterschied beträgt nur einige 20 %, während Lichtwitz Differenzen bis zum 40fachen Wert findet. Auch die Verwendung einer offenbar sehr invertasearmen[3]) Hefe könnte bei dem andern Gang seiner Versuche eine Rolle gespielt haben.

Dem zweiten Teil der Lichtwitzschen Versuche können wir eine Beweiskraft in dem von ihm vertretenen Sinne nicht

---

[1]) Auch H. Euler und D. Johansson sprechen sich in einer kürzlich erschienenen Mitteilung (Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 98, 1913) gegen Lichtwitz aus.

[2]) Annales de l'Inst. Pasteur 26, 556, 1912.

[3]) Sonst wäre sein Befund, daß Invertase und Zymase gleich schnell wirken (a. a. O. S. 149) ganz undenkbar.

zuerkennen. Es scheint wegen der großen Kompliziertheit der Verhältnisse nicht statthaft, aus dem Verlauf der Gärung Rückschlüsse auf den der Invertierung zu ziehen. Ebensowenig ist es erlaubt, in gärenden Zuckerlösungen den noch vorhandenen Zuckergehalt polarimetrisch zu bestimmen[1]). Auch wird die Erklärung von Lichtwitz den von ihm beobachteten Erscheinungen nicht voll gerecht; er ist vielmehr zu einigen äußerst unwahrscheinlichen Hilfshypothesen gezwungen, wie z. B. der, daß die Hemmung der Invertase bei 4% Invertzucker noch nicht merkbar, bei 8 bis 10% schon vollständig ist[2]).

Man könnte Zweifel haben, ob das zur Feststellung der Invertasevermehrung von uns eingehaltene Verfahren für die von uns daraus gezogenen Schlußfolgerungen ausreichend ist. Unsere Methode ist sicherlich nicht ganz exakt. Erstens haben wir nie den Invertasegehalt der von der Hefe abgetrennten Lösung untersucht, obwohl bestimmt aus den abgestorbenen Zellen eine beträchtliche Menge Enzym an sie abgegeben wird. Ferner geht nicht der gesamte Invertasevorrat der Zelle in den Preßsaft über, sondern bleibt zum Teil im rückständigen Preßkuchen. Auch das Ausfällen mit Aceton könnte zu Ungenauigkeiten Anlaß geben. Wir haben trotz dieser Mängel unsere Versuchsanordnung beibehalten, weil das eigentliche Ziel unserer Untersuchung, die Herstellung hochaktiver Invertasepräparate, durch sie nicht beeinflußt wird und weil für diesen Zweck das Preßsaftverfahren wohl das geeignetste ist. Aber unsere Methode erscheint auch zur Untersuchung von Veränderungen des Invertasegehalts genau genug, da es sich stets nur um Vergleichsversuche handelt und in diesen die Fehler stets etwa in gleicher Weise zur Geltung kommen müssen. Der Sicher-

[1]) Weder bei der Gärung mit Preßsaft (E. Buchner und F. Klatte, diese Zeitschr. 9, 417, 1908) noch bei der mit lebender Hefe (H. Euler und D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 347, 1912).

[2]) Man würde den meisten Schwierigkeiten aus dem Wege gehen, wenn man annähme, daß die von Lichtwitz verwendete Reinhefe „Oppenheimer Kreuz“ doch keine Reinkultur war, sondern neben einer Invertase führenden Rasse den in Weinhefe häufigen invertasefreien Saccharomyces apiculatus enthielt. (Über die Eigenschaften dieses Pilzes, besonders im Gemisch mit anderen Hefen vgl. F. Lafar, Handb. d. techn. Mykologie, Jena 1905 bis 1907, 4, S. 320ff.)

heit halber haben wir einen Vergleich mit der von Euler benutzten Methode, die direkt die lebende Hefe zur Messung des Invertasegehalts verwendet[1]), angestellt und dabei eine ausgezeichnete Übereinstimmung gefunden.

Experimenteller Teil.

I.

Bei der zunächst angeführten Versuchsreihe ließen wir abgepreßte untergärige Bierhefe in reiner Rohrzuckerlösung bestimmte Zeiten (1 bis 2 Tage) lagern und unterbrachen dann die Gärung durch Einwerfen von Eis. Von der sich bald zu Boden setzenden Hefe wurde abdekantiert und eine Probe zur Anfertigung von Preßsaft und Acetonfällung entnommen; der Rest wurde mit neuer Zuckerlösung überschichtet usf. Derartige „Führungen" (die in den folgenden Tabellen kurz mit F_1, F_2, F_3 usw. bezeichnet sind) wurden so oft wiederholt, bis die Hefemenge verbraucht war. Dies trat bei der zu einigen Versuchen angewandten eiweißarmen Münchener Hefe[2]) stets früher ein als bei der meist gebrauchten Berliner Schultheißhefe, weil im ersteren Falle die Verluste durch Selbstverzehrung größer waren.

Die Prüfung der im Exsiccator gut getrockneten Acetonfällungen auf ihren Invertasegehalt wurde, wie in der vorigen Abhandlung, mit 0,002 g oder 0,004 g in mit etwas Salzsäure oder primärem Natriumphosphat schwach angesäuerter Zuckerlösung bei 20° vorgenommen (Methode A und B). Wieder wurde als Faktor zur Berechnung der Enddrehung α_∞ aus α_0 die Zahl 0,32 benutzt.

1.

4 kg Hefe wurden in 150 l 15%iger Zuckerlösung eingetragen und nach je einem Tage in neue Zuckerlösung überführt. Der steigende Invertasegehalt der Hefe in den hierbei erhaltenen 3 Führungen ergibt sich aus folgender Tabelle, die die Wirksamkeit der Acetonfällungen angibt:

---

[1]) H. Euler und S. Kullberg, Zeitschr. f. physiol. Chem. 71, 20, 1911.

[2]) Die Verwendung von Münchener Hefe (Schroder) ist stets eigens vermerkt.

Inversion bei 19°. $\alpha_0 = 4{,}55°$, $\alpha_\infty = 358{,}54°$. Dauer der Inversion ($t$) 300 Min. November 1910.

	Enzymmenge E	Abgelesener Drehungswinkel α	$k \cdot 10^5$ $\left(k = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x}\right)$
Ausgangshefe (A)	0,002	3,34	38
	0,004	2,30	68
1. Führung (F_1) .	0,002	2,62	56
	0,004	1,26	115
2. Führung (F_2) .	0,002	1,62	97
	0,004	359,91	214
3. Führung (F_3) .	0,002	1,26	115
	0,004	359,55	258

Verbesserung 3,5 : 1 bzw. 3,8 : 1.

2.

Etwa 7 kg Hefe wurden mit 100 l 15 %iger Zuckerlösung versetzt. Diese wurde täglich, im ganzen noch 11 mal, erneuert. Vom 3. Male an wurden nur 80 l Zuckerlösung angewandt.

Inversion bei 23°. $\alpha_0 = 4{,}38°$, $\alpha_\infty = 358{,}60°$. Dezember 1910.

	E	t	α	$k \cdot 10^5$
A	0,002	300	3,09	37
	0,004	300	2,00	77
F_3	0,002	300	1,61	94
	0,004	300	359,96	204
F_6	0,002	300	0,93	132
	0,004	300	359,33	300
F_9	0,002	300	1,08	122
	0,004	300	359,53	264
F_{12}	0,002	300	0,05	200
	0,004	300	359,04	373

Verbesserung 5,4 : 1 bzw. 4,9 : 1.

Der Versuch zeigt deutlich, daß die Invertaseanreicherung bei längerer Dauer der Rohrzuckerbehandlung nicht gleichmäßig vor sich geht, sondern gewissen unkontrollierbaren Schwankungen ausgesetzt ist. So ist das Resultat der 9. Führung sogar noch etwas schlechter als das der sechsten; trotzdem ließ sich daraus durch weiteres Behandeln mit Zucker die sehr invertasereiche Hefe der 12. Führung gewinnen. Ein Vergleich

der hieraus erhaltenen Acetonfällung mit den Präparaten von C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1]) und von H. Euler[2]) nach der von diesen Autoren befolgten Untersuchungsmethode ergab die Aktivität $+0 = 21{,}7'$.

Wenn bei diesem Versuch der Gehalt der Acetonfällungen an Reininvertase einen nennenswerten Betrag erreicht hätte, so hätte sich die Verfünffachung der Enzymmenge wohl in einer Veränderung der analytischen Zusammensetzung geltend machen müssen. Dies ist aber, wie unten gezeigt wird, nicht der Fall; man ersieht daraus wieder, wie geringfügige Mengen Invertase selbst in so stark aktiven Präparaten vorhanden sind.

Analysen der Acetonfällungen aus den Preßsäften der Ausgangshefe (A), der dritten (F_3) und zwölften Führung (F_{12}):

A: 0,4827 g verbrauchten (nach Kjeldahl) 25,8 ccm $^n/_{10}$-HCl, 0,3816 g gaben (nach Carius) 0,0164 g $BaSO_4$ und 0,0156 g $Mg_2P_2O_7$;

F_3: 0,5157 g verbrauchten 29,0 ccm $^n/_{10}$-HCl;

F_{12}: 0,3386 g „ 18,0 „ „

0,3384 g gaben 0,0135 g $BaSO_4$,

0,3400 g „ 0,0168 g $Mg_2P_2O_7$.

Gefunden:	N	S	P_2O_5
A	7,48	0,59	2,61
F_3	7,87	—	—
F_{12}	7,48	0,55	3,08

3.

1,5 kg Hefe wurden zuerst mit 17, später mit 8 l 15 %iger Zuckerlösung 6 mal bei etwa 16° behandelt.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 4{,}30°$, $\alpha_\infty = 358{,}62°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
23. X. 1912	A	255	3,25	35
24.	F_1	255	2,87	49
25.	F_2	255	2,57	62
26.	F_3	255	2,40	69
27.	F_4	255	1,78	100
28.	F_5	255	1,56	112
30.	F_6	255	1,35	125

Verbesserung 3,6 : 1.

[1]) Journ. Chem. Soc. 57, 834, 1890.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 69, 157, 1910.

Zurückgewonnen wurden bei der Entnahme der einzelnen Proben für die Preßsäfte im ganzen 750 g Hefe, also die Hälfte der ursprünglich angewandten Menge. Die andere Hälfte ist, abgesehen von den geringfügigen Verlusten beim Dekantieren, auf Rechnung der bei längerem Lagern in der Zuckerlösung eintretenden Selbstverzehrung zu setzen.

4.

6 kg Hefe wurden mit 100 l einer 15%igen Zuckerlösung bei 16° wie oben wiederholt vorbehandelt. Von der 4. Führung an setzte sich die Hefe beim Eintragen von Eis nur schlecht ab, ein Teil erfüllte die ganze Flüssigkeit in feiner Verteilung („Staubhefe"); gleichzeitig erfolgte rasche Abnahme durch Selbstverzehrung. Von nun an wurden nur 50 l Zuckerlösung verwendet. 7 Führungen.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 4,40°$, $\alpha_\infty = 358,61°$.

Datum	t	α	$k \cdot 10^5$
21. VI. 1912	240	3,57	27
26.	240	2,32	80
29.	240	1,85	104
2. VII.	240	1,07	153

Verbesserung 5,7 : 1.

Angestellte Vergleichsproben ergaben bei den Preßsäften der 4. und 6. Führung fast völliges Verschwinden der ursprünglich ziemlich hohen Gärkraft[1]). 20 ccm Preßsaft der ursprünglichen Hefe (A) mit 8 g Rohrzucker und 0,2 ccm Toluol versetzt, gaben einen CO_2-Verlust von 0,72 g.

0,92 g Acetonfällung (F_4) gelöst in 10 ccm Wasser (die Konzentration entspricht 10 ccm Preßsaft A), gaben mit 4 g Rohrzucker und 0,1 ccm Toluol einen CO_2-Verlust $< 0,01$ g.

20 ccm Preßsaft (F_6) gaben mit 8 g Rohrzucker und 0,2 ccm Toluol einen CO_2-Verlust $< 0,01$ g[2]).

5.

Etwas langsamer erfolgt die Anreicherung in 10%iger Zuckerlösung.

[1]) Bestimmung nach E. und H Buchner und M. Hahn, Die Zymasegärung 1903, S. 83.

[2]) Weitere Versuche hierüber siehe 11 bis 13.

7,5 kg Hefe wurden bei 15 g in 10%iger Zuckerlösung (116 l, von F_{10} an 58 l) behandelt. Von der 10. Führung an nahm die Hefemenge beträchtlich ab.

0,002 g. Inversion bei 20,5°. $\alpha_0 = 4,39°$, $\alpha_\infty = 358,60°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
16. XI. 1911	A	240	3,72	22
17.	F_1	240	3,21	41
23.	F_5	240	2,46	73
28.	F_9	240	1,61	118
2. XII.	F_{13}	240	1,58	120

Verbesserung 5,5 : 1.

Bei den letzten 4 Führungen war also eine weitere Steigerung des Invertasegehalts der Hefe nicht mehr erfolgt. Um zu sehen, daß diese durch stärkere Zuckerkonzentration erreichbar wäre, wurde der Versuch mit 15%iger Zuckerlösung fortgesetzt (75 l, ab F_{15} 38 l). Hierbei ergab sich, ähnlich wie bei Versuch 2, ein fortwährendes Auf- und Abschwanken des Invertasegehalts.

0,002 g. Inversion bei 20,5°. $\alpha_0 = 4,46°$, $\alpha_\infty = 358,57°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
5. XII. 1911	F_{15}	240	1,35	136
7.	F_{17}	240	1,83	107
9.	F_{19}	240	1,41	132
12.	F_{21}	240	1,66	117
14.	F_{23}	240	1,54	124

Die stärkste Verbesserung war bei der 15. Führung erreicht; sie betrug aber nur das 1,3fache des vorher erzielten Wertes, das 6,2fache des Wertes der Ausgangshefe.

6.

In einem gleichzeitig angestellten Versuch wurde mit derselben Hefe und ebenfalls in 10%iger Zuckerlösung der Einfluß der Stickstoffnahrung studiert.

1,5 kg Hefe wurden mit 25 l Zuckerlösung versetzt, welche noch 100 g Ammonsulfat (= 0,4%) und 30 g Pepton enthielt. Die hier einsetzende Gärung war bedeutend lebhafter als bei dem Parallelversuch. Während sich die Hefe dort beim Abkühlen der Gärlösung regelmäßig gut abgesetzt hatte, schwamm

sie hier, als Staubhefe die ganze Flüssigkeit durchsetzend, herum und war auch durch 2 Tage langes Stehen bei 0° nur unvollkommen zum Absitzen zu bringen. Nach dieser Zeit wurde, soweit es ging, dekantiert und ein Teil der Hefe durch Kolieren für die Gewinnung von Preßsaft abgetrennt, der Rest, diesmal ohne Stickstoffzusatz, mit 10 l neuer 10%iger Zuckerlösung versetzt. Nach 2 Tagen ließ sich die Hefe in normaler Weise dekantieren. Die Zuckerlösung wurde erneuert, nunmehr wieder unter Zusatz von Ammonsulfat, aber in bedeutend geringerer Menge (5 g in 10 l); trotzdem war hier das Bild das gleiche wie beim ersten Male. Erst nach zweitägigem Stehen bei 0° hatte sich genügend Material für die Herstellung von Preßsaft abgesetzt.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 4,39°$, $\alpha_\infty = 358,60°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
17. XI. 1911	A	240	3,80	19
20.	F_1	240	3,84	36
24.	F_2	240	3,00	50
27.	F_3	240	2,50	70

Verbesserung 3,7 : 1.

Die Verbesserung schreitet hier zwar rascher voran als bei dem entsprechenden Versuch ohne Stickstoff; doch wird dies durch die rapide Selbstverzehrung der Hefe und die große Unbequemlichkeit des Aufarbeitens praktisch wertlos gemacht.

7.

Ähnliche Erfahrungen wurden beim Arbeiten in stärker konzentrierten (20%igen) Zuckerlösungen ohne Stickstoffzusatz gemacht. Auch hier erfolgte raschere Verbesserung, dafür aber schnelle Abnahme der Hefemenge und verhältnismäßig schlechtes Absitzen, so daß mit den angewandten 2 kg Hefe in 25 l Zuckerlösung nur 4 Führungen vorgenommen werden konnten.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 4,32°$, $\alpha_\infty = 358,62°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
7. XI. 1911	A	255	3,73	19
8.	F_1	255	3,10	41
9.	F_2	255	2,68	58
12.	F_4	255	1,29	129

Verbesserung 6,8 : 1.

8.

Großen Einfluß auf die Invertaseanreicherung übt die Temperatur aus. Sie war bei dem folgenden Versuch nur etwa 4 bis 6°. Hierbei erfolgte trotz der vorgenommenen 10 Führungen in 20%iger Zuckerlösung (3 kg Hefe auf 25 l) nur ein langsames Ansteigen des Invertasegehalts.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 4,46°$, $\alpha_\infty = 358,77°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
10. I. 1912	A	240	4,08	12
11.	F_1	240	3,61	28
16.	F_5	248	3,48	32
20.	F_7	158	3,42	55
26.	F_{10}	249	2,61	66

Verbesserung 5,5 : 1.

9.

Folgender, bei 10 bis 15° angestellter Parallelversuch zeigt das raschere Ansteigen des Invertasegehalts in der konzentrierteren Zuckerlösung. Je 6 kg Hefe wurden mit je 60 l 20 bzw. 15%iger Zuckerlösung behandelt. Das Volumen der Zuckerlösung wurde im Laufe des Versuchs auf 25 l reduziert. Auch hier erschöpfte sich die Hefemenge in der konzentrierteren Zuckerlösung ungleich schneller.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 5,12°$, $\alpha_\infty = 358,36°$.

a) In 20%iger Lösung (6 Führungen):

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
24. II. 1912	A	185	4,65	17
28.	F_2	240	3,97	34
1. III.	F_3	184	3,49	65
7.	F_5	253	2,69	76
8.	F_6	252	1,50	132

Verbesserung 7,8 : 1.

b) In 15%iger Lösung (10 Führungen):

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
24. II. 1912	A	185	4,65	17
27.	F_3	240	3,78	40
6. III.	F_6	184	2,31	127
8.	F_8	251	2,62	80
10.	F_{10}	256	1,32	140

Verbesserung 8,3 : 1.

Schwächung der Zymase bei gleichzeitiger Anreicherung des Invertasegehalts[1]).

10.

3,7 kg Münchener Hefe wurden in 100 l 15 $^0/_0$iger Zuckerlösung eingetragen, nach 2 Tagen in 60 l, nach weiteren 2 Tagen in 10 l neuer Zuckerlösung überführt. Temperatur etwa 15°. Die Hefe nahm außerordentlich schnell an Menge ab; daher nur 3 Führungen.

0,002 g. Inversion bei 20,5°. $\alpha_0 = 4,34°$, $\alpha_\infty = 358,61°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
2. X. 1912	A	240	3,53	28
4.	F_1	240	2,93	51
7.	F_2	240	1,85	103
9.	F_3	240	1,86	103

Verbesserung 3,7 : 1.

Von den Preßsäften wurden je 20 ccm zur Bestimmung der Gärkraft benutzt (8 g Rohrzucker, 0,2 ccm Toluol, Temperatur 26°, Gärdauer 4 Tage). Da die einzelnen Preßsäfte verschieden konzentriert waren und daher ganz verschiedene Ausbeuten an Acetonfällung ergaben, sind in der zweiten Spalte daneben die auf gleiche Mengen Acetonfällung reduzierten Vergärungszahlen angeführt.

	CO_2-Verlust g	CO_2-Verlust, reduziert auf gleiche Mengen Acetonfällung
A	0,279	0,279
F_1	0,426	0,208
F_2	0,016	0,012
F_3	0,015	0,006

11.

4 kg Münchener Hefe wurden je 2 Tage mit 15 $^0/_0$iger Zuckerlösung behandelt. Das ursprüngliche Volumen (60 l) wurde wegen der raschen Hefeverluste erst auf 50, dann auf 20 l vermindert.

---

[1]) Vgl. Versuch 4.

0,002 g. Inversion bei 20,5°. $\alpha_0 = 4,72°$, $\alpha_\infty = 358,49°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
29. X. 1912	A	240	3,83	28
31.	F_1	240	3,12	54
2. XI.	F_2	240	1,84	112
4.	F_3	240	1,86	111

Verbesserung 4,0 : 1.

Gärkraftbestimmungen bei 26° (20 ccm Preßsaft, 8 g Rohrzucker, 0,2 ccm Toluol, 4 Tage):

	CO_2-Verlust g	CO_2-Verlust, reduziert auf gleiche Mengen Acetonfällung
A	0,250	0,236
F_1	0,494	0,694[1])
F_2	0,148	0,227
F_3	0,053	0,083

12.

5,2 kg Hefe bei 20° in 100 l einer 10%igen Zuckerlösung. Das Volumen wurde bei der fünften Führung auf 50 l, bei der neunten auf 25 l vermindert.

0,002 g. Inversion bei 20,5°. $\alpha_0 = 4,81°$, $\alpha_\infty = 358,46°$.

Datum		t	α	$k \cdot 10^5$
11. XII. 1912	A	239	3,92	27
13.	F_2	240	2,71	73
14.	F_3	240	2,33	90
16.	F_4	240	1,79	117
18.	F_5	240	2,00	106
19.	F_6	240	1,47	135
21.	F_7	240	0,87	176
23.	F_9	240	1,23	150
27.	F_{10}	240	0,46	209

Verbesserung 7,8 : 1.

Bei der letzten Führung lag die Hefe schmierig am Boden und war, wie eine Probe nach dem Ausfärben mit Methylenblau unter dem Mikroskop zeigte, fast völlig abgestorben. Trotzdem ist das hieraus gewonnene Präparat das aktivste, das nach dieser Methode überhaupt erhalten wurde[2]).

[1]) Auch Euler und Johansson haben ein solches anfängliches Steigen der Gärkraft beobachtet (Zeitschr. f. physiol. Chem. 84, 107, 1913).

[2]) Nur wenig schwächer ist das Präparat F_{12} des Versuchs 2.

Aus den nachfolgenden Gärkraftbestimmungen, die mit je 20 ccm Preßsaft, 8 g Rohrzucker und 0,2 ccm Toluol sowohl für sich als auch nach Zugabe von je 20 ccm Kochsaft bei 24° angestellt wurden, geht hervor, daß in unseren Versuchen zunächst das Koenzym noch stärker geschwächt wird als die Zymase selbst (vgl. A und F_2). Nach einiger Zeit ist aber auch die Schwächung der Zymase so beträchtlich, daß durch nachträglich zugefügten Kochsaft nur noch geringe Aktivierung erfolgt.

	CO_2-Verlust g	CO_2-Verlust nach Zusatz von Kochsaft
A	0,341	0,635
F_2	0,064	0,402
F_3	0,060	0,377
F_4	0,020	0,130
F_5	0,034	0,181
F_6	0,026	0,028[1]
F_7	0,017	0,028
F_9	0,010	0,008

13.

Haltbarkeit der Invertase beim Lagern der Hefe in Eiswasser. Nach 4, 6 und 11 Tagen wurden Proben entnommen. Die aus ihnen erhaltenen Preßsäfte bzw. Acetonfällungen zeigten eine schwache Verbesserung.

0,002 g. Inversion bei 20°. $\alpha_0 = 4{,}37°$, $\alpha_\infty = 358{,}60°$.

Datum	t	α	$k \cdot 10^4$
9. II. 1912	202	3,97	15,4
13.	240	3,80	18,8
15.	179	3,93	19,3
20.	240	3,74	20,9

II.

Bei den folgenden Versuchen wurde die Hefe nach der von H. Euler und D. Johansson[2]) beschriebenen Methodik mit einer sterilisierten Lindnerschen Nährlösung behandelt, die im Liter 0,25 g Magnesiumsulfat, 5 g primäres Kaliumphosphat, 4 g Asparagin und 20 g der betreffenden Zuckerart

[1]) Von hier an wurde neu dargestellter Kochsaft aus anderer Hefe benutzt.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 390, 1911/12.

enthielt. In der Regel wurden für jeden Einzelversuch je 5 g Hefe auf 500 ccm der Lösung verwendet.

Die Untersuchung der einzelnen Hefeproben erfolgte nach dem Filtrieren und viermaligem Auswaschen im allgemeinen nach H. Euler und H. Meyer, also ohne Zusatz eines Antisepticums. 1 g der kurze Zeit auf Ton getrockneten Hefe wurde genau abgewogen, in 40 ccm 1%iger primärer Natriumphosphatlösung suspendiert und von dieser gut durchgeschüttelten Mischung je 10 ccm zu 20 ccm einer 20%igen Rohrzuckerlösung bei 20° hinzupipettiert. Bei späteren Versuchen wurden 50 ccm Phosphatlösung angewandt, so daß die jeweils untersuchte Hefemenge nur 0,2 g statt 0,25 g betrug. Nach bestimmten Zeiten wurden je 10 ccm 5%iger Sodalösung zugefügt. Hierauf mußte sofort abfiltriert werden, weil sonst die Inversion, wenn auch sehr langsam, weiter ging. Die Polarisation erfolgte bei 20°. Zugleich wurde jedesmal ein Anteil der Hefe zur Bestimmung des Trockengehaltes bei 100° bis zur Konstanz getrocknet.

1. Vergleich von Fructose und Invertzucker. (29. X. 1912.)

Die Invertzuckerlösung wurde aus gleichen Teilen Glucose und Fructose bereitet. Zur Anwendung kamen hier und bei den folgenden Versuchen die reinsten Präparate von Kahlbaum.

Die Temperatur der Vorbehandlung betrug erst 28°, nach 22 Stunden 26°.

Ausgangshefe (Münchener Hefe), je 0,25 g. $\alpha_0 = 13{,}00°$, $\alpha_\infty = 355{,}84°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
15,0	11,42	27
26,0	10,88	22
35,0	9,93	25
46,5	8,95	25

Trockengehalt: 25,4%.

1. Nach 22 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}09°$, $\alpha_\infty = 355{,}82°$.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
15,5	5,00	177
20,5	2,17	219
31,0	359,37	221
40,5	358,61	195

Trockengehalt: 24,8%.

Invertzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
15,5	5,11	173
20,5	3,42	177
31,0	0,79	175
40,5	359,09	178

Trockengehalt: 25,4%.

2. Nach 47 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}13^\circ$, $\alpha_\infty = 355{,}79^\circ$.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
11,0	5,60	224
17,5	2,82	224
25,5	0,37	226
35,0	358,40	235

Trockengehalt: 25,1 %.

Invertzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
11,0	6,38	195
19,5	2,78	202
25,0	1,34	198
35,0	359,30	198

Trockengehalt: 26,8 %.

3. Nach 71 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}04^\circ$, $\alpha_\infty = 355{,}83^\circ$.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,0	3,91	328
18,0	0,67	306
25,5	358,50	317
35,0	357,25	309

Trockengehalt: 29,2 %.

Invertzucker.

t	α	$\alpha \cdot 10^4$
10,5	5,25	249
18,0	2,49	229
25,5	0,20	233
35,0	358,49	232

Trockengehalt: 28,4 %.

Nach 89stündigem Lagern der Hefe wurde die Nährlösung in beiden Reihen erneuert. Nach weiterem 75stündigem Stehen bei 26° lag die Hefe schmierig am Boden und erteilte den Lösungen einen unangenehmen Geruch. Wie schon aus dem abnorm hohen Trockengehalt hervorgeht und wie durch Ausfärben einer Probe mit Methylenblau bestätigt wurde, war sie so gut wie völlig abgestorben.

4. $\alpha_0 = 12{,}98^\circ$, $\alpha_\infty = 355{,}84^\circ$.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,0	0,25	590
19,5	357,84	478
20,0	357,74	478
31,0	356,43	473

Trockengehalt: 55,5 %.

Invertzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
12,5	2,19	345
18,5	0,11	326
25,0	358,17	346
35,0	357,24	312

Trockengehalt: 45,7 %.

Aus dem Durchschnitt der beiden mittleren Konstanten eines jeden Versuchs berechnen sich für einen Trockengehalt von 25 % folgende Werte von $k \cdot 10^4$:

Ausgangshefe 23.

Stunden	Fructose	Invertzucker
22	222	173
47	224	186
71	267	203
89 + 75	215	187

2. Vergleich von Glucose und Rohrzucker.[1] (4. X. 1912.)

Angewandt je 0,25 g Münchner Hefe. Versuchstemperatur 28°.

Ausgangshefe. $\alpha_0 = 13{,}14°$, $\alpha_\infty = 355{,}80°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
15	11,19	34
25	10,55	28
35	9,45	30
45	8,46	30

Trockengehalt: 26,0 %.

1. Nach 26 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}02°$, $\alpha_\infty = 355{,}83°$.

Glucose.

t	α	$k \cdot 10^4$
15,5	7,76	102
25	5,67	97
35	3,41	101
45	2,20	96

Trockengehalt: 25,6 %.

Rohrzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
15,5	7,16	117
25	4,86	112
35	2,54	116
48	1,22	109

Trockengehalt: 24,6 %.

2. Nach 72 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}13°$, $\alpha_\infty = 355{,}80°$.

Glucose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,5	8,95	114
20,5	6,50	102
30	4,06	107
40	1,99	112

Trockengehalt: 25,6 %.

Rohrzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	8,74	127
20	5,75	120
30,5	3,21	121
40	1,17	127

Trockengehalt: 25,2 %.

3. Nach 96 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}13°$, $\alpha_\infty = 355{,}80°$.

Glucose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,5	8,97	114
20	6,76	100
30	4,00	104
40,5	2,18	107

Trockengehalt: 24,8 %.

Rohrzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	7,81	159
20,5	5,07	132
30	2,59	136
40,5	0,53	139

Trockengehalt: 24,1 %.

Aus den mittleren Werten berechnet sich für einen Trockengehalt von 25 % (wie oben) für $k \cdot 10^4$:

[1]) Vgl. H. Euler und D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem. 76, 391, 1911/12 und H. Euler und H. Meyer, ebenda 79, 275, 1912.

Ausgangshefe 28.

Nach Stunden	Auf Glucose	Auf Rohrzucker
26	97	115
72	103	120
96	105	139

3. Vergleich von Glucose, Rohrzucker, Invertzucker, Fructose. (12. XI. 1912.)

Zur Untersuchung wurden je 0,2 g Hefe angewandt außer in 1.

Ausgangshefe (Münchner Hefe). $\alpha_0 = 13{,}07^\circ$, $\alpha_\infty = 355{,}82^\circ$.

t	α	$k \cdot 10^4$
25,5	11,42	17
32,5	10,87	18
38	10,51	18
55	9,53	18

Trockengehalt: 27,4 %.

1. Nach 22 Stunden bei 25°. Bei den folgenden 4 Messungen wurden je 0,25 g Hefe angewandt; die auf 0,2 g umgerechneten Konstanten sind in der vierten Spalte aufgeführt. $\alpha_0 = 12{,}95^\circ$, $\alpha_\infty = 355{,}85^\circ$.

Glucose.

t	α	$k_1 \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$
11,5	7,39	145	116
20	4,74	142	114
30	1,97	149	119
40	359,04	182	145

Trockengehalt: 25,6 %.

Rohrzucker.

t	α	$k_1 \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$
12,5	5,44	201	161
22,5	2,44	184	148
30,5	0,59	183	147
41	358,84	184	148

Trockengehalt: 25,9 %.

Invertzucker.

t	α	$k_1 \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$
10	7,30	174	140
20	2,78	196	156
30	359,93	207	166
40	357,79	236	189

Trockengehalt: 25,5 %.

Fructose.

t	α	$k_1 \cdot 10^4$	$k \cdot 10^4$
11,5	6,70	172	137
19,5	3,14	190	152
31,5	359,93	197	158
40,5	357,92	226	181

Trockengehalt: 27,5 %.

2. Nach 46 Stunden bei 25°. $\alpha_0 = 13{,}08^\circ$, $\alpha_\infty = 358{,}82^\circ$.

Glucose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	8,43	135
20	5,01	136
30	2,03	147
41	0,09	150

Trockengehalt: 25,2 %.

Rohrzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	8,15	145
20	4,56	147
30	1,47	161
40	359,99	154

Trockengehalt: 23,4 %.

Invertzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	8,23	142
20	3,98	162
30	1,13	171
40	359,18	178

Trockengehalt: 24,4 %.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,5	7,81	150
20	3,91	164
29,5	1,07	175
40	359,10	180

Trockengehalt: 28,9 %.

3. Nach 70 Stunden bei 25°. $\alpha_0 = 12,96^\circ$, $\alpha_\infty = 355,85^\circ$.

Glucose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	7,98	149
20	4,06	159
30	1,07	172
40	359,24	176

Trockengehalt: 27,4 %.

Rohrzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	7,60	164
20,5	3,15	180
30	0,55	187
40	358,74	193

Trockengehalt: 28,0 %.

Invertzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	6,65	200
20	2,05	220
30	359,16	238
40	357,75	239

Trockengehalt: 30,1 %.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	6,55	204
22	1,59	215
30,5	359,22	231
40	357,71	240

Trockengehalt: 26,1 %.

4. Nach 24 Stunden wurde die Hefe bei einem vierten, gleichzeitig angestellten Versuch abfiltriert und mit neuer Nährlösung 72 Stunden bei 25° stehen gelassen. Nach dieser Zeit war die Hefe wieder schmierig geworden, und ihre Menge hatte sich in allen Versuchen stark vermindert. Beim Invertzuckerversuch konnte nicht einmal mehr genügend Material zur Bestimmung des Trockengehalts gewonnen werden.

$\alpha_0 = 13,12^\circ$, $\alpha_\infty = 355,80^\circ$.

Glucose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	6,64	203
20	1,34	248
30	358,56	266
40	357,23	272

Trockengehalt: 40,4 %.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
6	6,44	349
14,5	0,48	392
24,5	357,38	425
31,5	356,74	402

Trockengehalt: 52,2 %.

Rohrzucker.

t	α	$k\cdot10^4$
21	359,02	347
31	357,26	347

Trockengehalt: 58,8 %.

Invertzucker.
(nur 0,15 g untersucht)

t	α	$k\cdot10^4$
20	0,06	305
berechnet für 0,2 g:		406

Aus den mittleren Werten berechnet sich für einen Trockengehalt von 25 % für $k\cdot10^4$:

Ausgangshefe 17,4.

	Glucose	Rohrzucker	Invertzucker	Fructose
Nach 22 Stunden	114	143	158	142
„ 46 „	140	165	172	147
„ 70 „	142	164	190	214
„ 94 + 72 „	159	148	—	196

4. Vergleich von Rohrzucker, Invertzucker und Fructose. (4. III. 1913.)

Bei den bisherigen Versuchen waren stets gleiche Gewichtsmengen Zucker (10 g in 500 ccm) angewandt worden. Genauer wäre es gewesen, wenn die Zuckermengen im Verhältnis 10 g Monose zu 9,5 g Rohrzucker abgewogen worden wären. Dies würde sich wahrscheinlich durch etwas höhere Reaktionskonstanten bei allen Versuchen mit Glucose, Fructose und Invertzucker angezeigt haben. Bei dem folgenden Versueh sollte darauf Rücksicht genommen werden, doch wurde durch ein Versehen bei der Berechnung zu den ersten drei Führungen statt weniger, mehr Rohrzucker (10,5 g in 500 ccm) benutzt. Wohl infolgedessen zeigt die auf Fructose gewachsene Hefe keine stärkere Inversionskraft als die auf Rohrzucker. Von der vierten Führung an wurde das Verhältnis 10,5 g Rohrzucker zu 11 g Monose eingehalten.

Die Hefe (untergärige Berliner Schultheißhefe) wurde in doppelt so großer Menge als bei den vorangehenden Versuchen (10 g in je 500 ccm Nährlösung) je 2 Tage bei 27° lagern gelassen und nach dieser Zeit, im ganzen 5 mal, in frische Nährlösung übergeführt. Untersucht wurden je 0,2 g.

Ausgangshefe. $\alpha_0 = 13,02^\circ$, $\alpha_\infty = 355,83^\circ$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,5	11,97	26,0
20	10,89	28,7
30	9,68	31,2
40	8,55	32,7

Trockengehalt: 35,8 %.

1. Nach 40 Stunden. $\alpha_0 = 12,98^\circ$, $\alpha_\infty = 355,85^\circ$.

Rohrzucker.			Invertzucker.			Fructose.		
t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$
10	9,82	88	10	9,71	92	10	9,96	84
20	6,90	95	20	6,72	99	20	6,29	107
30	4,41	100	30	4,07	106	30	3,59	115
40	2,25	107	40	1,96	112	40	1,42	122
Trockengehalt: 25,3 %.			Trockengehalt: 24,0 %.			Trockengehalt: 25,8 %.		

2. Nach 40 + 48 Stunden. $\alpha_0 = 13,12^\circ$, $\alpha_\infty = 355,80^\circ$.

Rohrzucker.			Invertzucker.			Fructose.		
t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^5$	t	α	$k \cdot 10^4$
10	7,20	182	10	7,43	173	10	5,76	240
20	2,68	200	20	2,92	193	20	2,64	202
30	359,63	218	30	359,84	211	30	359,72	215
40	357,99	225	40	358,33	209	41	358,20	210
Trockengehalt: 30,6 %.			Trockengehalt: 30,3 %.			Trockengehalt: 29,8 %.		

3. Nach 40 + 48 + 48 Stunden. $\alpha_0 = 12,96^\circ$, $\alpha_\infty = 355,85^\circ$.

Rohrzucker.			Invertzucker.			Fructose.		
t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$
10	5,98	228	10	6,41	210	10	6,01	226
20	1,12	255	20	1,60	237	20	1,52	240
30	358,23	286	30	358,73	258	30	358,84	253
40	357,07	287	40	357,34	265	40	357,74	239
Trockengehalt: 35,2 %.			Trockengehalt: 34,2 %.			Trockengehalt: 33,1 %.		

4. Nach 40 + 48 + 48 + 48 Stunden. $\alpha_0 = 12,94^\circ$, $\alpha_\infty = 355,85^\circ$.

Rohrzucker.			Invertzucker.			Fructose.		
t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$
10	6,63	200	12	5,18	203	10	5,33	247
20	1,55	239	20	2,03	221	20	0,95	268
32	359,11	231	30	358,96	247	30	358,30	282
40	357,64	243	40	357,55	251	40	357,11	284
Trockengehalt: 34,1 %.			Trockengehalt: 36,4 %.			Trockengehalt: 37,3 %.		

5. Die Menge der Hefe hatte bis zu diesem Versuch ganz bedeutend abgenommen. Zum Überführen einer letzten, wie

bei 4. vorbehandelten, Probe wurden daher nur je 250 ccm Lindnerscher Nährlösung angewendet (enthaltend 5 g Fructose, bzw. 4,8 g Rohrzucker). Ein Invertzuckerversuch wurde nicht mehr angestellt.

Nach 39 Stunden wurde die Hefe abfiltriert. Unter dem Mikroskop betrachtet zeigte sie einen sehr hohen Prozentsatz mit Methylenblau färbbarer, also toter Zellen (schätzungsweise 50 bis 66%), während die ursprüngliche Hefe nur etwa 10% färbbare Zellen enthalten hatte. Immerhin waren auch hier noch einige in Sprossung begriffene Zellen vorhanden.

$\alpha_0 = 13{,}18^\circ$, $\alpha_\infty = 355{,}78^\circ$.

Rohrzucker.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	4,86	282
20	0,07	304
30	357,68	321
40	356,78	316

Trockengehalt: 39,6%.

Fructose.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	3,81	336
20	359,00	366
30	357,04	380
40	356,48	350

Trockengehalt: 47,5%.

Die Reduktion der mittleren Werte auf einen Trockengehalt von 25% ergab für $k \cdot 10^4$:

Ausgangshefe 21.

	Rohrzucker	Invertzucker	Fructose
1. Führung	97	107	107
2. „	171	166	175
3. „	192	181	186
4. „	169	161	183
5. „	197	—	196

Auch hier zeigen sich, wie bei den Versuchen mit reiner Zuckerlösung (s. o.), bei länger fortgesetzter Behandlung Schwankungen im Invertasegehalt, der sich offenbar nicht über eine gewisse Grenze hinaus steigern läßt.

5. Vergleich von Rohrzucker, Fructose (Kahlbaum) und Fructose (Schering). (24. IV. 1913.)

Es wurde die Möglichkeit nachgeprüft, ob die von Lichtwitz[1]) erhaltenen ungünstigen Resultate abhängig wären von der von ihm benutzten (von Schering stammenden) Fructose, die im Gegensatz zu der von uns gebrauchten Fructose (von

[1]) s. o. S. 130.

Kahlbaum) aus Invertzucker, nicht aus Inulin bereitet ist. Der Versuch ergab aber (bei zwei Führungen), daß beide Fructosesorten ungefähr gleich günstig auf die Invertaseproduktion einwirkten, und zwar beide besser als Rohrzucker. Angewandt wurden auf je 500 ccm Lindnerscher Nährlösung je 10,5 g Fruchtzucker bzw. 10 g Rohrzucker und je 5 g Hefe (Schultheißhefe). Versuchstemperatur 27°. Untersucht wurden je 0,2 g Hefe.

Ausgangshefe. $\alpha_0 = 13{,}06°$, $\alpha_\infty = 355{,}83°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	11,98	28
21	9,33	40
30	10,05	36
40	8,18	35

Trockengehalt: 37,8%.

1. Nach 41 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}07°$, $\alpha_\infty = 355{,}83°$.

Rohrzucker.			Fructose (Kahlbaum).			Fructose (Schering).		
t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$
10	9,22	110	10	8,64	129	10	8,44	136
20	5,65	122	21	4,88	133	20	5,12	134
30	3,04	126	31,5	2,39	137	30	2,47	138
40	0,89	132	40	0,01	153	40	0,49	142

Trockengehalt: 24,2%. Trockengehalt: 23,1%. Trockengehalt: 23,7%.

2. Nach 49 + 40 Stunden. $\alpha_0 = 13{,}27°$, $\alpha_\infty = 355{,}75°$.

Rohrzucker.			Fructose (Kahlbaum).			Fructose (Schering).		
t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$	t	α	$k \cdot 10^4$
10	6,71	204	—	—	—	7,7	8,46	181
20	2,31	214	20	2,30	214	20	2,70	201
30	359,33	228	30,5	359,31	227	30	0,00	205
41	357,84	226	41	357,81	227	40	358,57	198

Trockengehalt: 33,7%. Trockengehalt: 30,9%. Trockengehalt: 27,3%.

Reduktion der mittleren Konstanten auf einen Trockengehalt von 25%:

Ausgangshefe 25.

	Rohrzucker	Fructose (Kahlbaum)	Fructose (Schering)
1. Führung.	128	146	144
2. "	164	178	186

6. Einfluß starker Zuckerkonzentrationen auf die Invertasevermehrung in der Hefe. (30. IV. 1913).

a) 50 g Schultheißhefe wurden in einer Lösung von 500 g Rohrzucker in 500 ccm Wasser suspendiert und ab und zu gut durchgeschüttelt. Es trat schwache Gärung ein, die auch am folgenden Tage bemerkbar war. Nach 39 stündigem Stehen bei etwa 30° wurde die sirupöse, die Hefe in ganz feiner Verteilung enthaltende Flüssigkeit mit Eis versetzt, nach längerem Stehen, soweit es ging, dekantiert, zuletzt zentrifugiert und zweimal in den Zentrifugengläsern ausgewaschen. Die schmierig abgesetzte Hefe wurde dann auf ein Filter gebracht, noch zweimal mit Wasser ausgewaschen und auf Ton getrocknet. Untersucht wurden wieder je 0,2 g.

Ausgangshefe.
$\alpha_0 = 13{,}39°$, $\alpha_\infty = 355{,}72°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
9,6	12,20	32
20	10,81	34
32	9,26	36
40	8,34	37

Trockengehalt: 35,4%.

Nach 39 Stunden Vorbehandlung.
$\alpha_0 = 13{,}27°$, $\alpha_\infty = 355{,}75°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	11,11	56
20	9,08	59
30	7,29	60
40	5,65	62

Trockengehalt: 38,2%.

b) 50 g Hefe wurden in 60%iger Zuckerlösung (enthaltend 600 g Zucker + 400 ccm Wasser) 40 Stunden bei 24° stehen gelassen und dann nach dem Abkühlen auf 0° abzentrifugiert.

Ausgangshefe.
$\alpha_0 = 13{,}04°$, $\alpha_\infty = 355{,}81°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
11,5	12,05	22
20,5	11,07	26
30,5	9,83	29
40	8,70	32

Trockengehalt: 31,8%.

Nach 40 Stunden Vorbehandlung.
$\alpha_0 = 13{,}24°$, $\alpha_\infty = 355{,}75°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	11,46	47
20,5	9,76	47
30,5	8,03	50
40	6,10	57

Trockengehalt: 42,6%.

Die Mittelwerte ergaben reduziert auf einen durchschnittlichen Trockengehalt von 35%:

	Versuch mit 50% Zucker	Versuch mit 60% Zucker
Ausgangshefe	35	30
Vorbehandelte Hefe . .	54	40

Also auch in diesen hochkonzentrierten Zuckerlösungen hat eine, wenn auch geringe, Invertasevermehrung in der Hefe stattgefunden. In diesem Zusammenhange war es von Interesse zu sehen, ob die Invertase überhaupt in so hohen Zuckerkonzentrationen zur Wirkung kommt. Th. Bokorny[1]) behauptet auf Grund von Gärversuchen mit lebender Hefe, daß die Invertase „schon bei 48 % Zucker aufhört zu arbeiten". Dem stehen aber Angaben von E. Buchner und W. Antoni[2]) und von H. Lange[3]) entgegen, die sogar in annähernd 60 %iger Zuckerlösung mit Hefepreßsaft noch Inversion bewirkten. Wir können dies durchaus bestätigen; tatsächlich findet selbst in so hochkonzentrierten Lösungen, und nicht einmal überaus langsam, Inversion des Rohrzuckers statt.

10 ccm Preßsaft aus frischer Hefe wurden zu je 90 ccm einer Lösung von 50 und 60 g Rohrzucker in 40 und 30 ccm Wasser gefügt, die außerdem noch je 1,3 g primäres Natriumphosphat enthielt. Nach 17 stündigem Stehen bei 18° wurden je 10 ccm abpipettiert, mit 3 ccm 2n-Natronlauge versetzt und auf 75 ccm verdünnt.

In 50 %iger Zuckerlösung:	In 60 %iger Zuckerlösung:
$\alpha_0 = 10{,}18^0$, $\alpha_\infty = 356{,}74^0$.	$\alpha^0 = 12{,}45^0$, $\alpha_\infty = 356{,}01^0$.
Gef.: $\alpha = 359{,}50^0$.	Gef.: $\alpha = 0{,}83^0$.
Invertiert: 79,3 % Zucker.	Invertiert: 70,7 % Zucker.

7.

Um die Leistungsfähigkeit der beiden Anreicherungsverfahren (Teil I und II) zu vergleichen sowie die Zuverlässigkeit der benutzten Inversionsmethoden zu prüfen, wurden mit ein und derselben Hefe (Schultheiß) folgende 3 Parallelversuche angestellt:

a) 500 g wurden 41 Stunden mit 20 l 15 %iger Zuckerlösung behandelt. Die Temperatur der Luft war 15 bis 15,5°, der Flüssigkeit (vor dem Abbruch der Gärung mit Eis) 17°.

---

[1]) Chem.-Zeitg. 27, 1106, 1903. Auch Bokorny hat, wie er am Schluß der gleichen Arbeit angibt, bei Verwendung großer Hefemengen in 58 und 65 %iger Zuckerlösung noch Inversion beobachtet, aber in größerem Betrage erst nach 14 tägigem Stehen.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 44, 215, 1905.

[3]) Wochenschr. f. Brauerei 24, 446, 1907.

Von der so erhaltenen Hefe wurde ein Teil direkt nach Euler untersucht, die Hauptmenge aber auf Preßsaft und Acetonfällung verarbeitet. Ebenso wurde bei b) und c) verfahren.

b) 500 g Hefe wurden ebenso wie bei a) 40 Stunden, aber im Brutschrank bei 24 bis 25° behandelt. Temperatur der Gärflüssigkeit, in der die Hefe milchig suspendiert war, vor Abbruch mit Eis 27,5 bis 28°.

c) 400 g Hefe wurden 40 Stunden mit 30 l der von Euler benutzten Lindnerschen Nährlösung behandelt (enthaltend im ganzen 7,5 g Magnesiumsulfat, 120 g Asparagin, 150 g primäres Kaliumphosphat und 600 g Rohrzucker). Temperatur der Luft 24 bis 25° wie bei b), der Lösung vor dem Dekantieren 26°.

Erhalten wurden bei

a) 300 g Hefe mit 36,4% Trockengehalt. Hieraus Preßsaft: 108 ccm, die 9,2 g Acetonfällung gaben.

b) 300 g Hefe mit 37,5% Trockengehalt. Hieraus Preßsaft: 93 ccm, die 4,5 g Acetonfällung gaben.

c) 257 g Hefe mit 29,4% Trockengehalt. Hieraus Preßsaft: 134 ccm, die 6,2 g Acetonfällung gaben.

Bei der Ausgangshefe (mit 32,6% Trockengehalt) gaben 800 g 220 ccm Preßsaft und 25,5 g Acetonfällung.

Untersuchung der lebenden Hefe (0,2 g):

Ausgangshefe.
$\alpha_0 = 12,94°$, $\alpha_\infty = 355,85$.

t	α	$k \cdot 10^4$
12,5	11,53	30
20	10,42	35
30	9,08	37
40,3	7,89	38

Trockengehalt: 32,6%.

a) Bei 15° vorbehandelt.
$\alpha_0 = 13,14°$, $\alpha_\infty = 355,79°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	9,88	90
20	7,16	92
30	4,58	98
40	2,58	102

Trockengehalt: 36,4%.

b) Bei 25° vorbehandelt.
$\alpha_0 = 13,14°$, $\alpha_\infty = 355,79°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10	10,00	87
20,3	7,32	87
30	4,74	96
40	3,10	93

Trockengehalt: 37,4%.

c) Bei 25° nach Euler vorbehandelt.
$\alpha_0 = 13,14°$, $\alpha_\infty = 355,79°$.

t	α	$k \cdot 10^4$
10,3	9,00	115
20	5,41	128
30,5	2,33	139
40,5	0,22	146

Trockengehalt: 29,3%.

Reduktion auf einen mittleren Trockengehalt von 35 %:

Ausgangshefe	39
Hefe a)	91
„ b)	86
„ c)	159

Untersuchung der Acetonfällungen (20°), wie bei Teil I:

	0,002 g. $\alpha_0 = 5,13°$, $\alpha_\infty = 358,36°$			0,004 g. $\alpha_0 = 4,95°$, $\alpha_\infty = 358,42°$		
	t	α	$k \cdot 10^5$	t	α	$k \cdot 10^5$
Ausgangshefe	242	4,08	30	280	2,71	65
Hefe a)	240	3,09	65	279	0,92	150
„ b)	240	3,36	55	276	1,19	135
„ c)	240	1,64	131	276	359,34	308

Die nach beiden Untersuchungsmethoden erhaltenen Reaktionskonstanten verhalten sich zueinander wie:

	Untersuchung der lebenden Hefe	Untersuchung der Acetonfällungen	
		0,002 g	0,004 g
Ausgangshefe . .	1 :	1 :	1 :
Hefe a)	2,33	2,16	2,31
„ b)	2,21	1,83	2,08
„ c)	4,07	4,37	4,74

Aus diesen Zahlen folgt zunächst, daß die Eulersche Versuchsanordnung zu einer schnelleren Invertaseanreicherung führt als die unsere. Dafür hat sie den großen Nachteil, daß man beim Arbeiten mit ihr außerordentlich große Flüssigkeitsmengen gebraucht. Für das von uns erstrebte Ziel, die Gewinnung hochaktiver Invertasepräparate, ist unser Verfahren auf jeden Fall einfacher.

Ferner geht aus der Tabelle eine ganz unerwartet gute Übereinstimmung in den Verbesserungsquotienten hervor, die nach den beiden so sehr verschiedenen Untersuchungsmethoden gefunden wurden.

Die Fällung von Kolloiden.

II. Mitteilung.

Von

K. Spiro.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg im Els.)

(Eingegangen am 3. Juli 1913.)

Bei der Quellung des Leimes hat Hofmeister[1]) zuerst festgestellt, daß die Salze bezüglich ihrer Wirkung sich in eine Reihe ordnen lassen, die dann später auch von andern Forschern, namentlich W. Pauli[2]), R. Höber[3]), mir[4]) u. a. bei andern physiologischen Vorgängen gefunden wurde. Schon vor einigen Jahren konnte ich zeigen, daß dieser „lyotropen" Reihe[5]) offenbar eine allgemeine physikalisch-chemische Gesetzmäßigkeit zugrunde liegt, daß man dieselbe Reihe z. B. bei der inneren Reibung, der Kompressibilität, der Oberflächenspannung usw. findet.

Zu den physiologisch-chemischen Prozessen, bei denen diese Reihe zu erkennen ist, gehört auch die Koagulation von Eiweißkörpern; bei dieser läßt sich nun, wie ich für die Milchgerinnung[6]) wahrscheinlich zu machen suchte, und wie Sörensen[7]) für die Hitze-Koagulation einwandfrei bewiesen hat, eine Änderung der Reaktion nachweisen. Eine ähnliche Änderung der Reaktion läßt sich auch bei der Fällung von Kolloiden

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **25**, 13 und **28**, 210.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **71**, 333. Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **2**, 15 bis 27 u. folg. Bde. **3**, 225.

[3]) Ebenda **11**, 35.

[4]) Ebenda **5**, 276.

[5]) Vgl. H. Freundlich, Habilitationsschrift, Leipzig 1906.

[6]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. **8**, 15, 365.

[7]) Diese Zeitschr. **31**, 397 (mit E. Jürgensen).

durch Alkohol und durch Salze nachweisen, ja auch ohne daß es zu einer Fällung kommt, zeigt sich, wie ich jetzt feststellen konnte, bei der Einwirkung von Salzen auf Eiweißstoffe resp. Aminosäuren eine Änderung der Reaktion.

Ich bin dieser Reaktionsänderung aus zwei Gründen nachgegangen, einmal weil Posternak[1]), Pauli und Höber vor einigen Jahren gezeigt haben, daß bei der Hitze-Koagulation der Eiweißkörper die Reihe sich umkehrt, wenn man statt bei schwach alkalischer, bei schwach saurer Reaktion die Erwärmung vornimmt, und ferner weil die Änderung der Reaktion einen erheblichen Einfluß auf die Quellung hat, worauf leider sehr zweifelhafte Hypothesen aufgebaut worden sind.

Bezüglich des letzten Punktes kann ich mich kurz fassen. Arbeitet man unter Bedingungen, die denen im Organismus entsprechen, d. h. variiert man die H- und OH-Ionen-Konzentration innerhalb der äußersten im Tierkörper denkbaren Breite ($p_H = 9{,}18$ für Na_2HPO_4 bis $p_H = 4{,}53$ für NaH_2PO_4) ohne Änderung des osmotischen Druckes und bei Anwesenheit der für den Tierkörper so wesentlichen Puffer, so fällt die Quellungszunahme bei der alkalischen und noch mehr bei der sauren Reaktion fast innerhalb der Fehlergrenzen. Die Schlüsse ergeben sich daraus von selbst.

Tabelle I.

Leimscheiben mit 86,07 % Wassergehalt.

Nach 20 stündiger Quellung zu $^1/_{15}$-molaren Phosphatgemischen.

p_H	9,18	7,73	7,38	7,17	7,00	6,81	6,64	6,47	6,24	5,91	5,60	4,49
Wassergehalt %	92,40	92,30	92,27	92,25	92,26	92,29	92,30	92,31	92,31	92,33	92,34	92,37

Die Zahlen sind die Mittelwerte aus mehreren Bestimmungsreihen.

Eine Einwirkung der Salze auf die Reaktion der Eiweißkörper ließ sich sowohl hinsichtlich der potentiellen als auch der aktuellen Reaktion nachweisen. Durch Variation der Indicatoren ließ sich für alle Salze, auch für die spezifischen, „Neutralsalze“ zeigen, daß sie als „Puffer“ wirken. Da die Verhältnisse ziemlich kompliziert sind und die Vorlegung eines sehr umfangreichen Tabellenmaterials erfordern, sollen sie in einer besonderen Arbeit mit Berücksichtigung der Literatur

---

[1]) Annales de l'Inst. Pasteur **15**, 85.

besprochen werden. Hier möchte ich in aller Kürze nur die Änderung zeigen, die die aktuelle Reaktion der Salze beim Zusammenbringen mit Eiweißstoffen erfährt.

Bezüglich der Methodik habe ich mich eng an Sörensen sowohl bezüglich des colorimetrischen als auch des elektrometrischen Verfahrens angeschlossen, letzteres diente nur zur gelegentlichen Kontrolle des ersteren. Die Salze waren von Kahlbaum und Merck bezogen. Als Eiweiß diente eine 1,38 % ige Eierklarlösung.

Tabelle II.

p_H der Eiweißlösung = 7,65.

	p_H der Salzlösung	p_H der Salzlösung + Eiweiß		p_H der Salzlösung	p_H der Salzlösung + Eiweiß
KCNS . .	4,96	7,65	$MgBr_2$ . .	7,08	7,30
KJ	— (?)	7,62	$Mg(NO_3)_2$.	4,08	7,38
KBr . . .	4,96	7,62	$MgCl_2$ . . .	4,96	7,40
KNO_3 . .	4,96	7,62	$MgSO_4$ . .	6,47	7,38
KCl . . .	6,24	7,58	Mg-Acetat .	6,83	6,84
K_2SO_4 . .	7,22	7,62	NH_4CNS .	4,96	6,84
KF	7,38	7,62	NH_4Br . .	4,96	6,84
K-Acetat .	7,02	7,02	NH_4NO_3 .	5,91	6,94
NaCNS . .	8,30	7,65	NH_4Cl . .	6,13	6,88
NaJ . . .	6,92	7,62	$(NH_4)_2SO_4$.	6,47	6,81
NaBr . . .	5,91	7,58	NH_4Fl . .	7,22	6,82
$NaNO_3$ . .	4,96	7,56	NH_4-Acetat	4,95	4,96
NaCl . . .	5,68	7,62	LiBr . . .	6,25	7,65
Na_2SO_4 . .	6,12	7,62	$LiNO_3$ . .	6,88	7,65
NaF . . .	7,34	— (?)	LiCl . . .	6,88	7,62
Na-Acetat .	7,58	7,58	Li_2SO_4 . .	7,21	7,65

Aus der vorstehenden Tabelle ergibt sich zunächst, daß für einzelne Salze mit der Abnahme der fällungshemmenden Wirkung, d. h. vom CNS zum F auch die Konzentration der H-Ionen abnimmt; am besten ist dies zu sehen an den Kalisalzen, wo nur das Jodid eine Ausnahme macht. Eine Ausnahme machen auch, vielleicht unter dem Einfluß der Kationen, die Anfangsglieder der Reihe bei den andern Salzreihen.

Beim Zusammenbringen mit genuinem Eier-Eiweiß (nicht mit Leim) zeigen nun alle Salze mit einer sehr wichtigen, gleich zu besprechenden Ausnahme, daß die H-Konzentration der Mischung nicht dem Mittel der beiden zusammengebrachten

Lösungen entspricht, sondern die H-Konzentration ist nach Zufügung der K-, Na-, Li-Salze die der ursprünglichen Eiweißlösung, bei den Mg-Salzen etwas, bei den NH_4-Salzen erheblich niedriger, aber auch hier unabhängig von der Art des Anions.

Eine charakteristische Ausnahme machen die Acetate, hier haben wir das Umgekehrte: die H-Ionen-Konzentration einer Eiweiß-Acetatmischung (Leim-Acetatmischung) ist nicht die der ursprünglichen Eiweißlösung (Leimlösung), sondern umgekehrt die der Acetatlösung.

Anders ausgedrückt können wir sagen: die K-, Na- und Li-Salze sind so schwache Puffer, daß ihre Reaktion gegenüber dem stärkeren Puffer Eiweiß, trotzdem dies in molar so niedriger Menge vorhanden ist, nicht in Betracht kommt, und auch bei den Mg- und NH_4-Salzen spielen die Anionen in dieser Richtung keine Rolle. Umgekehrt sind die Salze schwacher Säuren derartig starke Puffer von so weitem Wirkungsbereich, daß ihnen gegenüber, wenn die Salze in molaren Mengen vorhanden sind, die Reaktionsverhältnisse des Eiweiß verschwinden. Allerdings ist auch hier die molar so niedrige Konzentration aller Eiweißlösungen zu berücksichtigen.

Da die Salze selbst eine schwache Reaktion haben, die Rhodanide sauer, die Fluoride alkalisch, wird es verständlich, daß erstere in der schwach alkalischen nativen, letztere umgekehrt in der angesäuerten Lösung die Eiweißfällung begünstigen, d. h. daß Ansäuerung, wie Höber fand, die Reihe umkehrt.

Ich möchte endlich hervorheben, daß durch die obigen Befunde anschaulich gemacht wird, daß in wässeriger Lösung Salze und Eiweiß eine „Verbindung" eingehen und wieso bei der Ausfällung der Eiweißlösungen durch Salze das ausgefällte Produkt, wie ich früher zeigte, ein Gemenge von beiden ist. Eine Umkehrung dieses Vorgangs in gewissem Sinne ist der Befund, daß die Löslichkeit von Säuren (z. B. der Benzoesäure und Salicylsäure) durch die aktuell neutralen, aber potentiell alkalischen Fluoride begünstigt wird: in Lösung geht unter Abnahme der H^+-Konzentration das Salz der Säuren, während sich aus den „neutralen" Fluoriden die sauren Salze bilden.

Bemerkungen zu der Mitteilung von Raffaele Paladino, „Untersuchungen über einige Veränderungen des Stoffwechsels bei Tieren nach Exstirpation der Schilddrüse und der Parathyroiden“[1]).

Von

J. Greenwald.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Montefiore Home, New York.)

(Eingegangen am 10. Juli 1913.)

In der angeführten Mitteilung verabsäumt Paladino völlig, die Arbeiten seiner Vorgänger auf diesem Gebiete zu erwähnen. Es existieren mehrere Veröffentlichungen über den Stoffwechsel des Stickstoffs, des Phosphors und des Calciums bei Tieren, denen man die Nebenschilddrüsen entfernt hat, mit oder ohne gleichzeitige Exstirpation der Schilddrüse. Die wichtigsten sind unten angegeben[2]).

Meiner Ansicht nach sind die Folgerungen, zu denen Paladino auf Grund seiner Versuche gelangt, vollkommen irrig. Er schreibt z. B.: „Es scheint, als ob nach vollständiger Entfernung des Organs die Phosphorausscheidung jedes Maß verloren hätte; sie nimmt außerordentlich zu, hauptsächlich in der Form der Erdalkaliphosphate, bis ihre Menge 3mal so groß wird wie beim normalen Tier.“ Für vollständig schilddrüsenlose Tiere hat Ver Ecke, und für parathyroidektomierte Hunde hat Schreiber dieser Zeilen bewiesen, daß nach Entfernung dieser Organe die Phosphorausscheidung auffallend vermindert ist. Diese Herabsetzung dauert an, bis Tetanie erscheint und manchmal auch länger. Dann

---

1) Diese Zeitschr. **50**, 497, 1913.

2) Roos, Zeitschr. f. physiol. Chem. **21**, 19, 1895. — Verstraeten und Vanderlinden, Mémoires courronnés de l'Académie royale de Médecine de Belgique **13**, 1894. — Ver Ecke, Arch. internat. de Pharmacodynamie **4**, 81, 1898. — Coronedi und Luzzatto, Arch. ital. de Biol. **47**, 286, 1901. — Underhill und Saiki, Joun. of Biolog. Chem. **5**, 225, 1908. — Mac Callum und Voegtlin, Journ. of Exper. Med. **11**, 118, 1909. — Cooke, Journ. of Exper. Med. **12**, 45, 1910; **13**, 439, 1911. — Greenwald, Journ. of Physiol. **28**, 103, 1911; Journ. of Biolog. Chem. **14**, 363, 1913.

steigt die Phosphorausscheidung und mag wohl die Norm überschreiten; dies ist aber höchstwahrscheinlich auf die Muskelarbeit bei der Tetanie zurückzuführen[1]). Die Angaben Paladinos über die Calciumausscheidung stehen auch in Widerspruch mit denen anderer Autoren[2]).

Daß Paladino zu falschen Schlüssen gelangt ist, erklärt sich daraus, daß er es unterließ, denjenigen Harn zu untersuchen, der in der Periode zwischen der Entfernung der Drüsen und dem Auftreten der Tetanie ausgeschieden wurde. Nach meiner Ansicht ist dies gerade die Zeit, in der man am sorgfältigsten untersuchen soll, da man dann erwarten darf, diejenigen Veränderungen des Stoffwechsels zu erkennen, die primär von dem Fehlen der Drüsen abhängen, im Gegensatz zu den Veränderungen, die auf die Tetanie, Hungerzustände usw. zurückzuführen sind.

---

[1]) Über den Einfluß der Muskelarbeit auf die Phosphorausscheidung siehe Engelmann, Arch. f. Anat. und Physiol. **1871**, 14. — Klug und Olsavsky, Arch. f. d. ges. Physiol. **54**, 21, 1893. — Dunlop, Paton, Stockman und Maccadam, Journ. of Physiol. **22**, 68, 1897.

[2]) Mac Callum und Voegtlin, Journ. of Exper. Med. **11**, 118, 1909. — Cooke, Journ. of Exper. Med. **12**, 45, 1910.

Über die Ausscheidung des Morphins im Harn.

Von

Wilhelm Ritter von Kaufmann-Asser.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 29. Juni 1913.)

In der im Jahre 1905 erschienenen Abhandlung über „Die Ausscheidung körperfremder Substanzen im Harn“ sagt Heffter[1]) zu Beginn der Besprechung über die Alkaloide:

„Für eine Reihe von Alkaloiden scheint der unveränderte Übergang in den Harn nachgewiesen zu sein, nur wenige werden ganz oder zum größten Teil in den Darm abgeschieden (Berberin, Morphin)“.

Später bei der speziellen Besprechung über das Morphin heißt es dann:

„Demnach scheint es, als ob die Nieren als Eliminationsorgane des Morphins eine untergeordnete Rolle spielen, und die seinerzeit lebhaft geführte Diskussion, ob das Alkaloid im Harn ausgeschieden wird oder nicht, hat heutzutage wesentlich historisches Interesse.“

In den älteren Arbeiten, bezüglich derer ich auf die angeführte Heffftersche Abhandlung verweise, finden sich, soweit die betr. Verfasser überhaupt Morphin im Harn fanden, keine genauen quantitativen Bestimmungen dieses Alkaloids im Harn, und es gab bis dahin noch keine rechten Vorstellungen über die im Harn vorkommenden Mengen des Morphins. Faust[2]) sprach daher (im Jahre 1900) die Ansicht aus, daß man „bei Untersuchungen über das Schicksal des Morphins im tierischen Organismus die im Harn erscheinenden Mengen der unveränderten oder umgewandelten Substanz unberücksichtigt lassen kann“. Und so sagt schließlich auch Heffter (a. a. O.) nach Erörterung der in Betracht kommenden Angaben über sowohl positive wie negative Befunde:

„Es handelt sich, wie aus allen diesen Untersuchungen hervorgeht, um Spuren, hinreichend, um mit den so empfindlichen Farbenreaktionen die Anwesenheit des Alkaloids darzutun.“

---

[1]) Ergebnisse d. Physiol., 4. Jahrg., **1905**.

[2]) Arch. f. experim. Pathol. **44**, 217.

So stand also die Frage nach der Ausscheidung des Morphins im Harn im Jahre 1905. Da erschien im Jahre 1907 eine Arbeit von van Rijn[1]), in der dieser mitteilte, daß er in dem Harn eines Kaninchens, dem er 200 mg Morphin teils per os, teils subcutan verabreicht hatte, 70,3 mg Morphin, d. h. 35% wiedergefunden habe. Einige Zeit später, 1912, berichtete dann Herrmann[2]), daß es ihm mit Hilfe der neuen biologischen Morphin-Nachweismethode (auf die ich sofort noch zurückkommen werde) gelungen sei, mit Harn, der nach 45 Minuten gewonnen wurde, 100% positiver Reaktionen zu erhalten. Infolge dieser Ergebnisse, durch die die alte Streitfrage wieder ins Rollen gebracht war, veranlaßte mich Herr Geheimrat Heffter, bei Kaninchen und Hunden von neuem die Ausscheidung des Morphins im Harn zu prüfen, und zwar sollte es sich dabei nicht bloß um den qualitativen Nachweis, sondern, wenn möglich, um quantitative Messungen handeln.

Analytische Methoden.

Zu diesem Zwecke wandte ich als erste die biologische Methode von Straub-Herrmann an.

Diese Methode beruht auf der Beobachtung, daß bei weißen Mäusen, denen eine Lösung von salzsaurem Morphin unter die Rückenhaut injiziert wird, sich regelmäßig nach Ablauf einiger Minuten eine Reihe von Erscheinungen zeigen, die hauptsächlich in einer charakteristischen lordotischen Rückenkrümmung und einer S-förmigen Schwanzkrümmung bestehen. Zur Prüfung von Harn auf Morphingehalt verfuhr Herrmann in folgender Weise: Der Harn wurde eingedampft, mit weinsaurem Alkohol versetzt und ca. 1 Stunde damit extrahiert, der Extrakt zur Trockne eingedampft, mit der gleichen Menge Wasser, wie ursprünglich Harn vorhanden war, aufgenommen, die Lösung filtriert, mit Natr. carbon. neutralisiert und dann den Mäusen injiziert.

Ich stellte nun zunächst eine größere Zahl von Vorversuchen an, die sich darauf bezogen, festzustellen, ob die Reaktion wirklich charakteristisch für Morphin ist. Zu diesem Zweck injizierte ich Aq. dest. und Lösungen von Cocain, Codein und Heroin. Bei allen diesen Injektionen erhielt ich die charak-

[1]) Pharmazeutisch Weekblad, 44. Jahrg., Nr. 46.
[2]) Biochem. Zeitschr. 39, Heft 3 und 4.

teristische Reaktion entweder garnicht, oder nicht bei den der Morphinlösung entsprechenden Mengen, so daß die Reaktion wohl als für Morphin charakteristisch anzusehen ist. Auch den Einfluß der Außentemperatur berücksichtigte ich, indem ich Mäuse untersuchte, nachdem ich sie längere Zeit auf der Heizung oder vor dem Fenster hatte stehen lassen. Hierbei konnte ich keinen Unterschied in der Auslösbarkeit der Reaktion feststellen. Dagegen kam ich bei Prüfung des Verhaltens normaler Mäuse ohne Injektion zu der Überzeugung, daß viele Mäuse als „übererregbar" von vornherein nicht zu gebrauchen sind. In jedem Falle müssen die Mäuse vor dem Versuch genau auf ihre normale Schwanzhaltung geprüft werden.

Dann ging ich zur Prüfung einer reinen Morphinlösung über und fand in Übereinstimmung mit Herrmann, daß als unterste Grenze für eine maximale Reaktion kein feststehender Wert anzugeben ist, sondern daß dieser Wert bei den verschiedenen Mäuselieferungen schwankt, und zwar durchschnittlich zwischen 0,03 mg und 0,001 mg, d. h. innerhalb verhältnismäßig großer Grenzen.

Bei den darauf folgenden Kontrollversuchen mit Kaninchenharn mit zugesetztem Morphin zeigte es sich nun, daß die Reaktion zu einer quantitativen Morphinbestimmung nicht anwendbar ist. Denn unter Berücksichtigung desjenigen Wertes, der bei den Kontrolltieren noch gerade eine maximale Reaktion auslöste und des nächstfolgenden, bei dem die maximale Reaktion fehlte, kamen bei den Versuchen Unterschiede heraus, die bis zu 1250 % des ursprünglich zugesetzten Morphins stiegen. Es muß also der Harn zusammen mit dem Morphin eine reaktionssteigernde Wirkung ausüben, da übereinstimmend angestellte Kontrollversuche mit reinem Harn die Reaktion nur bei größeren Mengen, nicht bei den entsprechend kleineren der injizierten Flüssigkeit ergaben. Somit war für meine Zwecke, d. h. zur quantitativen Bestimmung des Morphins im Harn, die biologische Methode nicht anwendbar, während sie zum qualitativen Nachweis und zur Kontrolle sich als sehr brauchbar erwies.

Ich prüfte nun den van Rijnschen Versuch nach, der folgendermaßen angestellt wird.

Ein Kaninchen erhält zuerst 100 mg Morph. hydr. per os, nachdem es 6 Stunden vorher zuletzt Futter erhalten hatte.

Direkt nach der Morphingabe bekommt es einige Endivienblätter. Nach $2^1/_2$ Stunden injiziert man subcutan weitere 100 mg Morph. hydr. und 6 Stunden nach der ersten Morphingabe wird das Tier getötet. Der Blaseninhalt (spontan läßt das Kaninchen während der Zeit nur einige wenige Kubikzentimeter Urin, die gesondert untersucht werden) wird nun mit Weinsäure angesäuert, eingedampft, der Rückstand mit 50 ccm Alkohol aufgenommen und einige Stunden damit erwärmt. Nach der Abkühlung wird der Extrakt koliert und der Auszug noch zweimal mit Alkohol wie vorher erwärmt. Die drei Kolaturen werden vereinigt und der dabei entstehende Niederschlag nach 24 Stunden abfiltriert. Das Filtrat wird bis auf einen kleinen Rest eingedampft und nach der Abkühlung mit Wasser aufgenommen. Diese wässerige Lösung wird nun mit Äther ausgeschüttelt, dann mit Ammoniak alkalisch gemacht und nochmals mit Äther ausgeschüttelt. Darauf wird mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und der Äther durch Erwärmen vertrieben. Danach werden 100 ccm warmer Amylalkohol aufgegossen, mit Ammoniak vorsichtig alkalisch gemacht und dann kräftig geschüttelt. Dieses wird noch zweimal wiederholt, erst mit 100 ccm, dann mit 50 ccm Amylalkohol. Die drei Mengen Amylalkohol jeder Ausschüttelung werden dann vereinigt. Dieser amylalkoholische Extrakt wird nun mit 25 ccm verdünnter Schwefelsäure ausgeschüttelt und dann wird die saure Reaktion mit Natr. carb. abgestumpft. Darauf wird mit Chloroform übergossen, mit Ammoniak alkalisch gemacht und ausgeschüttelt. Das wird so lange fortgesetzt, bis die wässerige Flüssigkeit keine Alkaloidreaktion mehr zeigt. Die Chloroformauszüge werden nun vereinigt, in einem gewogenen Becherglas bis auf einen kleinen Rest eingedampft, der dann mit der 50fachen Menge Petroläther vermengt wird. Nach 24 Stunden scheidet sich ein krystallinischer Niederschlag ab. Die Flüssigkeit wird nun abgegossen und das Becherglas bei 95^0 bis zu einem konstanten Gewicht getrocknet.

Bei diesem Verfahren fand van Rijn im Urin 70,3 mg Morphin = 92 mg Morphin hydrochlor. wieder, d. h. $35^0/_0$ Morphin oder $46^0/_0$ des gegebenen Morph. hydrochlor.

Bei dem von mir genau nach diesen Angaben angestellten Versuch fand ich in der Hälfte des aus der Blase gewonnenen

Harns (die andere Hälfte benutzte ich zur biologischen Methode) nur 4 mg einer krystallinischen Substanz wieder, die sich aber bei der qualitativen Prüfung durch die Fröhdesche und Marquissche Reaktion nicht als Morphin erwiesen. Diese qualitative Nachprüfung fehlt bei van Rijn und deshalb sind seine Angaben auch nicht verwertbar, da es sich eben bei den Krystallen nach meiner Erfahrung nicht um Morphin handelt.

Nachdem diese beiden Methoden also versagt hatten, arbeitete ich nunmehr nach folgendem Verfahren:

Der mit 10%iger Weinsäure angesäuerte Harn, der durch ständige Kontrolle des Käfigs und Reinigung desselben, sobald Faeces vorhanden waren, nicht mit den Faeces in Berührung kommen konnte, wurde eingedampft, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen und während einer Stunde mit Alkohol in einem Apparat mit Rückflußkühlung extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde wiederum eingedampft, der Rückstand mit Wasser aufgenommen und mit Ammoniak alkalisch gemacht. Dann wurde die wässerige Lösung 24 Stunden lang im Chloroformextraktionsapparat mit Rückflußkühlung extrahiert und darauf der Chloroformextrakt bis auf einige Kubikzentimenter eingedampft. Im Scheidetrichter wurde dann der Chloroformrückstand mit Äther, Wasser und 30 ccm $^{n}/_{20}$-Salzsäure ausgeschüttelt (3 mal je 5 Minuten) und darauf die wässerige Lösung mit Hilfe einer alkoholischen Jodeosinlösung titriert.

Um zu entscheiden, was diese Methode überhaupt leistet, stellte ich zunächst Leerversuche mit reinem Harn und Kontrollversuche mit Harn, dem nachträglich Morphin zugesetzt war, an.

Durch die Leerversuche mit reinem Harn bestimmte ich, wieviel Kubikzentimeter $^{n}/_{20}$-HCl allein schon durch reinen Harn bei der Titration gebunden werden. Wie Tabelle I zeigt, schwanken diese Werte konstant zwischen — 0,15 und + 0,25 ccm. (Diese 0,25 ccm entsprechen 4,7 mg Morphin.) Das ist die erste zu berücksichtigende Fehlerquelle der Methode.

Tabelle I.

Versuch	Harnmenge	Geb. Kubikzentimeter $^{1}/_{20}$-HCl
1	50	— 0,15
2	25	— 0,15
3	70	+ 0,25
4	40	+ 0,25

Die dann folgenden Kontrollversuche dienten dazu, zu prüfen, wie weit die Methode überhaupt zur Bestimmung des Morphins verwertbar ist. Dazu stellte ich eine Reihe von Versuchen mit Harn an, dem eine bestimmte Menge Morphin zugesetzt war. Die Ergebnisse dieser Versuche zeigt Tabelle II. Aus ihr geht hervor, daß die wiedergefundenen Morphinmengen zwischen 68 und 83 % schwanken, im Durchschnitt also nur 70 % betragen, was einer Fehlerquelle von 30 % entspricht, die bei den eigentlichen Versuchen als 2. Fehlerquelle zu berücksichtigen ist.

Tabelle II.

Versuch	Harnmenge	Zugesetztes Morphin mg	Wiedergefundenes Morphin mg	%
1	35	52,5	36	68,5
2	60	6,0	5	83,0
3	40	60,0	41	68,0
4	40	60,0	43	71,0
5	40	60,0	42	70,0

Bei einem Versuch dieser Reihe (4) modifizierte ich die Methode derart, daß ich an Stelle der Chloroformextraktion die wässerige Lösung 3 mal je 20 Minuten lang mit heißem Chloroform ausschüttelte, ohne aber eine Verbesserung der Methode dadurch zu erzielen.

Zur Kontrolle prüfte ich ferner bei einem anderen Versuch (5):

a) den Rückstand des alkoholischen Extrakts,
b) einen zweiten alkoholischen Extrakt,
c) die wässerige Lösung nach der 24 stündigen Chloroformextraktion

qualitativ auf Morphin. Bei a) und b) fand sich kein Morphin, dagegen trat bei c) eine schwache positive Reaktion nach Marquis ein. Diese war auch durch länger andauernde Chloroformextraktion nicht zu beseitigen. Es bleibt also ein geringer Bruchteil des Morphins zurück, der nicht in den Chloroformextrakt übergeht.

Bei allen diesen Kontrollen, ebenso wie später bei den eigentlichen Versuchen, wandte ich zum Schluß zum qualitativen Nachweis, daß es sich wirklich um Morphin handelt, die biologische Methode derart an, daß ich aus der titrierten Flüssigkeit zunächst den Äther vertrieb, dann auf dem Wasserbad die Flüssigkeit auf ein Drittel des Volumens einengte und den Rest mit der 3 fachen Menge heißen Chloroforms 3 mal ausschüttelte. Aus dem Chloroformextrakt wurde dann das Chloroform abdestilliert, der Rückstand mit wenigen Kubikzentimetern schwach mit verdünnter Salzsäure angesäuerten Wassers aufgenommen und die wässerige Lösung mit Natrium bicarbonatum schwach alkalisch gemacht. Diese Flüssigkeit wurde dann Mäusen nach der Herrmannschen Vorschrift injiziert.

Nachdem also die Grenzen festgestellt waren, bis zu denen die angegebene Methode genau arbeitet, konnte ich zu den eigentlichen Versuchen übergehen.

In den Versuchen der ersten Reihe (Tabelle III) prüfte ich den Harn von 7 Kaninchen (im Gewicht von 890 bis 2400 g) und einem Hunde (5950 g). Die Anwendungsweise des Morphins war bis auf Versuch Nr. 6 und 7, bei denen das Morphin intravenös injiziert wurde, subcutan. Die Kaninchen erhielten je 200 mg Morph. hydrochlor. im ganzen in 2 maligen Injektionen von je 100 mg innerhalb von 2 Stunden (jedesmal 2,5 ccm einer 4 %igen Lösung). Nur bei Versuch Nr. 6 injizierte ich nur 120 mg intravenös auf einmal. Der Hund (Nr. 1) erhielt subcutan innerhalb von 5 Stunden 3 mal je 280 mg Morphin (7 ccm einer 4 %igen Lösung) = 840 mg im ganzen. Der Harn wurde bei den Kaninchen abwechselnd nach 24 und 48 Stunden untersucht, nach welcher Zeit die Tiere getötet wurden, um den Blaseninhalt vollständig zu erhalten und mitverwerten zu können. Der Versuch Nr. 6 dauerte $2^1/_2$ Stunden, da hier der Harn mit Hilfe eines Dauerkatheters gewonnen wurde. Das Tier starb bei der Nachspülung der Blase; die Blase erwies sich bei der Sektion als vollständig leer. Die Versuchsdauer bei dem Hunde betrug 24 Stunden, nach welcher Zeit der Hund gleichfalls getötet wurde, um den Blaseninhalt zu gewinnen.

Tabelle III.

Nr.	Gewicht des Kaninchens g	Injektion	Injizierte Menge mg	Versuchsdauer Std.	Harnmenge ccm	Wiedergefund. Morphin mg	%	mit Fehlerberechnung %	Biologische Kontrolle
				Kaninchen.					
1	890	subcutan	200	43	120	6	3,0	4,0	+
2	1320	„	200	24	70	46	23,0	30,0	+
3	1530	„	200	48	150	23	11,5	15,0	+
4	1950	„	200	24	140	12	6,0	8,0	+
5	1920	„	200	24	160	30	15,0	19,5	+
6	1160	intraven.	120	$2^1/_2$	—	9	7,5	10,0	+
7a	2400	„	200	24	170	8	4,0	5,0	+
7b				24	80	2?	1,0?	Fehlergrenze	—
				Hund.					
1	5950	subcutan	840	24	330	48	5,7	7,2	+

Wie die Tabelle zeigt, konnte ich in jedem dieser Versuche Morphin quantitativ nachweisen, die Prozentzahl des wiedergefundenen Morphins schwankt bei den Kaninchen zwischen 3 und 23% und beträgt beim Hund 5,7%. Auffallend sind die Differenzen in den verschiedenen Versuchen, einen Anhaltspunkt für diese Schwankungen habe ich nicht finden können. Wenn man die vorhin genannten beiden Fehlerquellen derart berücksichtigt, daß man 1. die 0,25 durch reinen Harn gebundenen Kubikzentimetern entsprechende Morphinmenge (= 4,7 mg) subtrahiert und 2. zu jedem Wert 30% der wiedergefundenen Menge hinzuaddiert, so schwankt die Prozentzahl zwischen 4 und 30 für die Kaninchen und beträgt beim Hund 7,2.

Bei dem Versuch 7b, in dem die Harnmenge des zweiten Tages für sich allein verarbeitet wurde, fanden sich nur 2 mg = 1% wieder; dieser Wert fällt in die Fehlergrenze, und hiermit übereinstimmend war auch bei diesem Versuch als dem einzigen dieser Reihe die biologische Reaktion negativ.

Um nun über die Ausscheidungsdauer des Morphins im Harn ein klares Bild zu gewinnen, injizierte ich (Tabelle IV) einem Kaninchen (Nr. 8) wie vorher 200 mg Morphin subcutan und stellte Versuche mit dem nach 48, 72, 96 und 120 Stunden entnommenen Harn an. Hierbei zeigte sich, daß nach 48 Stunden die Morphinausscheidung als beendet zu betrachten ist,

ein Resultat, das durch die jedesmal angestellte biologische Reaktion bestätigt wurde.

Tabelle IV.

Kaninchen 8: 2380 g, 200 mg subcutan injiziert.

Zeitdauer nach der Injektion Std.	Harnmenge ccm	Wiedergefundenes Morphin mg	%	mit Fehlerberechnung %	Biologische Kontrolle
48	380	30	15,0	17	+
72	190	3?	1,5?	Fehlergrenze	—
96	25	1?	—	„	—
120	120	2?	—	„	—

Nunmehr ging ich zu Dauerversuchen an einem Hund und einem Kaninchen über. Tabelle V zeigt die Ergebnisse einer durch 17 Tage fortgesetzten subcutanen Morphininjektion bei einem ca. 6 kg schweren Hund (Nr. 2). Derselbe erhielt am 1. Tag in 3 Malen 840 mg Morph. hydrochlor., an den folgenden je 280 mg; im ganzen (an zwei Sonntagen erhielt er keine Injektion) also 4,76 g. Der Harn wurde alle zwei (nach einem

Tabelle V.

Tag	Gewicht g	Injiz. Morph. pro dosi mg	im ganzen g	Harnmenge ccm	Wiedergefund. Morphin mg	%	mit Fehlerberechnung %	Biologische Kontrolle
1	5900	840	—	—	—	—	—	
2	—	280	1,12	—	—	—	—	
3	—	280	1,40	290	54	4,8	6,2	+
4	—	280	1,68	—	—	—	—	
5	—	—	1,68	—	—	—	—	
6	—	280	1,96	610	58	10,4	13,4	+
7	—	280	2,24	—	—	—	—	
8	—	280	2,52	530	27	4,8	6,2	+
9	4850	280	2,80	—	—	—	—	
10	—	280	3,08	—	55	9,8	12,6	+
11	—	280	3,36	—	—	—	—	
12	—	—	3,36	—	—	—	—	
13	—	280	3,64	—	13	2,3	3,0	+
14	4870	280	3,92	—	—	—	—	
15	—	280	4,20	—	37	6,0	8,5	+
16	—	280	4,48	—	—	—	—	
17	4930	280	4,76	—	15	2,6	3,4	+
					259			

dazwischenliegenden Sonntag drei) Tage untersucht. Die Harnmenge betrug zuerst 290, 610, 530 ccm und war dann, da der Hund bei seiner großen Unruhe stets den Wassernapf verschüttete, nicht mehr festzustellen. Unmittelbar nach den Injektionen der ca. ersten 10 Tage erbrach der Hund, nachher vertrug er die Injektionen ohne Störung seines Befindens. Zum Schluß hob sich auch wieder sein zuerst gesunkenes Körpergewicht, und 14 Tage nach Beendigung der Versuche war ihm nichts Abweichendes mehr anzumerken. Es war Vorsorge getroffen, daß der Harn weder mit den Faeces, noch dem Erbrochenen in Berührung kam.

Wie die Tabelle V lehrt, fanden sich in jeder Harnuntersuchung zum Teil erhebliche Mengen Morphin wieder (am 3. Tag 54, 6. Tag 58, 10. Tag 55 mg). In Prozenten für die innerhalb der letzten 48 Stunden gegebene Morphinmenge umgerechnet, ergeben sich zugleich unter Berücksichtigung der beiden Fehlerquellen Werte zwischen 3 und 13,4 %. Zusammengerechnet fand ich von 4,76 g injizierten Morphins 0,259 g = 5,4 % oder mit Berücksichtigung der Fehler der Methode 6,9 % wieder.

Waren dieses schon verhältnismäßig große Werte, so fand ich bei dem Dauerversuch mit einem Kaninchen (Tabelle VI) noch sehr viel höhere.

Das Kaninchen (Nr. 9) von 2450 g Gewicht erhielt während 19 Tagen mit Ausnahme eines Sonntags subcutane Injektionen von Morph. hydrochlor., und zwar 14 Tage lang 200 mg in je 2 Portionen (= 2 mal je 2,5 ccm einer 4 %igen Lösung), dann an 2 Tagen je 300 mg und an 3 Tagen je 400 mg, im ganzen 4,4 g. Das Tier vertrug die Injektionen ausgezeichnet, zeigte weder auffallende Unruhe, noch Apathie und fraß wie immer. Es wurde mit Grünzeug und Rüben gefüttert; für die Sauberhaltung des Käfigs war Vorsorge getroffen. Nach der letzten Injektion wurde der bis dahin alle zwei (nur zweimal drei) Tage) untersuchte Harn noch an den drei darauf folgenden Tagen untersucht; zu der letzten Harnmenge wurde der aus dem getöteten Tier entnommene Blaseninhalt (5 ccm) hinzugefügt. Zwei Versuche (5. und 14. Tag) mißlangen, da die Röhre des Chloroformextraktionsapparates sprang. Die Harnmenge schwankte innerhalb verhältnismäßig kleiner Grenzen.

Tabelle VI.

Tag	Gewicht	Injiziert. Morph. pro dosi mg	Injiziert. Morph. im ganzen g	Harnmenge ccm	Wiedergefund. Morphin mg	Wiedergefund. Morphin %	Wiedergefund. Morphin mit Fehlerberechnung %	Biologische Kontrolle
1	2450	200	—	—	—	—	—	
2	—	200	0,4	—	—	—	—	
3	—	200	0,6	204	16	4,0	5,0	+
4	—	200	0,8	—	—	—	—	
5	—	200	1,0		Versuch	mißlungen		
6	—	200	1,2	—	—	—	—	
7	—	—	1,2	—	—	—	—	
8	—	200	1,4	210	48	12,0	15,5	+
9	—	200	1,6	—	—	—	—	
10	—	200	1,8	180	79	19,7	25,0	+
11	2230	200	2,0	—	—	—	—	
12	—	200	2,2	225	120	30,0	39,0	+
13	—	200	2,4	—	—	—	—	
14	—	200	2,6		Versuch	mißlungen		
15	—	300	2,9	—	—	—	—	
16	—	300	3,2	85	80	16,0	20,8	+
17	—	400	3,6	—	—	—	—	
18	—	400	4,0	105	80	11,4	14,8	+
19	—	400	4,4	—	—	—	—	
20	2300	—	—	210	80	10,0	13,0	+
21	—	—	—	90	24	3,0	3,3	+
22	—	—	—	110	2	Fehlergrenze		+
				(+5 Blas. Inhalt)	529			

Die wiedergefundenen Morphinmengen stiegen zunächst stark an in einer Reihe von 16, —, 48, 79, 120 mg oder prozentualiter der in den dem Versuch vorangehenden 48 Stunden injizierten Morphinmenge von 5 bis 39 %. Dann fielen die gefundenen Werte wieder und hielten sich zunächst eine Zeitlang konstant auf 80 mg (= 20,8, 14,8, 13,0 %).

In dem 48 Stunden nach der letzten Injektion untersuchten Harn (21. Tag) fanden sich noch 24 mg = 3,3 %, am nächsten (22.) Tag, d. h. 72 Stunden nach der letzten Injektion, 2 mg, eine Menge, die in die Fehlergrenze fällt; doch war hier ebenso wie bei sämtlichen anderen Versuchen die biologische Kontrollreaktion positiv.

Bei der Untersuchung des Harns am 12. Tage, bei dem die überraschend hohe Menge von 120 mg wiedergefundenen Morphins sich ergab, gelang es mir, aus dem Chloroformextrakt durch Ammoniak krystallinisches Morphin zu gewinnen und aus diesem mit Hilfe von Salzsäure Morphinum hydrochloricum

darzustellen. Die Krystalle ergaben die positive Marquissche und Fröhdesche Reaktion. Bisher ist es nur Marmé, Schneider und Landsberg gelungen, Morphin krystallinisch aus Harn zu erhalten.

Im ganzen wurden bei diesem Dauerversuch von 4,4 g injizierten Morphin 529 mg im Harn wiedergefunden, d. h. 12 % oder mit Berücksichtigung der Methodenfehler 15,5 %. Man könnte nun wohl mit Recht für die beiden mißlungenen Versuche Werte einsetzen, die nach dem Verlauf der Reihe mit ziemlicher Sicherheit anzunehmen sind, und zwar für den Versuch des 5. Tages in dem ansteigenden Teil der Werte zwischen 16 und 48 mg 30 mg und für den des 14. Tages im absteigenden Teil zwischen 120 und 80 mg 100 mg. Dann würde die Gesamtmenge des im Harn wiedergefundenen Morphins 659 mg = 14,9 % resp. 19,3 % betragen.

Bei diesem Kaninchen erhob ich bei Untersuchung der Faeces von 24 Stunden des 19./20. Tages auch den auffallenden Befund, daß ich in ihnen nur 10 mg Morphin wiederfand, also eine im Verhältnis zu der Ausscheidung im Harn nur geringe Menge.

Zur Beantwortung der Frage, ob das Morphin längere Zeit im Körper zurückbehalten wird, nachdem die Ausscheidung im Harn auf eine quantitativ nicht mehr bestimmbare Grenze gesunken ist, untersuchte ich hier auch noch nach Tötung des Tieres (72 Stunden nach der letzten Morphininjektion) die Nieren, Leber und den Magen auf Morphin. Dabei fand ich folgende Werte:

Tabelle VII.

	Wiedergefundene Morphinmenge mg	% der Gesamtmenge des injizierten Morphins	Biologische Kontrolle	Marquissche Reaktion
Nieren	6	0,13	+	schwach +
Leber	20	0,45	+	+
Magen	27	0,63	+	+

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß 72 Stunden nach der letzten Morphininjektion in den drei untersuchten Organen noch 53 mg = 1,2 resp. 1,4 % der Gesamtmenge des injizierten Morphins nachzuweisen waren. Dieses Ergebnis steht in direktem

Gegensatz zu den Angaben Rübsamens[1]), der bei Untersuchungen an Ratten fand, daß 17 Stunden nach der letzten Dosis, bei einer 13 Tage lang mit Morphin vorbereiteten Ratte, überhaupt im ganzen Rattenkörper, der in toto auf Morphin geprüft wurde, nichts von dem Alkaloid mehr nachzuweisen war.

Daß auch beim Menschen, im Gegensatz zu den vielen negativen Untersuchungsergebnissen, Morphin im Harn in quantitativ nachweisbaren, verhältnismäßig großen Mengen vorhanden ist, geht aus einem Bericht hervor, der von der Medizinalabteilung des preußischen Kriegsministeriums Herrn Geheimrat Heffter zugegangen ist, und den dieser mir für meine Arbeit zur Verfügung stellte. Bei einem Soldaten, der nachweisbar 1,5 g Morphin suicidii causa genommen hatte und mit Hilfe von Atropin, Magenspülungen, Campherinjektionen und 12stündiger künstlicher Atmung am Leben erhalten wurde, konnten im Harn der ersten ca. 24 Stunden 0,135 g Morphin nachgewiesen werden, d. h. 9 % der genommenen Menge.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse meiner angestellten Versuche folgende:

Zusammenfassung.

I. Die biologische Methode von Straub-Herrmann ist zur quantitativen Bestimmung des Morphins im Harn nicht anwendbar.

II. Nach der van Rijnschen Methode läßt sich aus Harn kein Morphin quantitativ nachweisen.

III. Als Ausscheidungsorgan für das Morphin kommen bei Kaninchen und Hunden die Nieren in höher als bisher angenommenen Maße in Betracht.

IV. Bei Dauerversuchen steigt die Menge des im Kaninchenharn ausgeschiedenen Morphins bis auf 39 %.

V. Bei Dauerversuchen ist noch 72 Stunden nach der letzten Injektion in Leber, Nieren und Magen Morphin quantitativ nachzuweisen.

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. 59, 243.

Über Kuppelung von Eiweißspaltungsprodukten an kolloidale Kohlenhydratketten.

Von

H. Friedenthal.

(Aus dem Privatlaboratorium des Verfassers, Nikolassee-Berlin.)

(Eingegangen am 5. Juli 1913.)

Mehrere Gründe aus dem Gebiet der Biologie lassen es möglich erscheinen, daß einer Reihe von lebensnotwendigen Eiweißstoffen eine Kohlenhydratkette zugrunde liegt. Tiere, selbst wachsende Tiere vermögen aus Eiweiß allein keinen Eiweißansatz zu bewirken. Gibt man Kohlenhydrate zum Eiweiß in der Nahrung, erfolgt der Eiweißansatz. Dies weist darauf hin, daß nach dem Zerschlagen der Eiweißmoleküle in die kleinen Bruchstücke, der vollständigen Verdauung, die Rückverwandlung in Eiweiß durch Zufuhr von Kohlenhydraten erleichtert wird.

Die niederen Tiere und Pflanzen zeigen einen höheren Gehalt an Kohlenhydraten als die höheren. Namentlich ist der Glykogenreichtum der niederen Tiere bekannt. Die Embryonen der höheren Tiere weisen durch ihren hohen Glykogengehalt ebenfalls auf ein Stadium der Vorelternreihen mit höherem Reichtum an Kohlenhydraten hin.

Wir wissen ferner, daß die Pflanzen unter der Einwirkung des Lichtes kolloidale Kohlenhydratketten zu bilden vermögen, und es scheint erlaubt anzunehmen, daß Eiweißkörper sich im Anschluß an diese Synthese durch Hinzufügen weiterer Komponenten bilden können.

Es fragt sich nun, ob der heutige Stand der Eiweißchemie es gestattet, aus den bekannten Erfahrungen über das Verhalten der Eiweißkörper, über deren Reaktionen und Spaltungsprodukte diese Annahme eines Aufbaues gewisser Eiweiß-

körper unter Zugrundelegung einer kolloidalen Kohlenhydratkette zu stützen.

Die bisherigen Versuche, Eiweiß künstlich darzustellen, haben bereits vielfach zu Produkten geführt, die einige Eigenschaften der Eiweißkörper aufwiesen, ohne die Summe der bekannten Eiweißcharakteristica zu umfassen, und namentlich (darauf möchte ich besonders hinweisen) ohne die prozentige Zusammensetzung der Eiweißkörper aufzuweisen.

Grimaux' eiweißähnliche Körper aus Asparaginsäureanhydrid + Harnstoff hatten die chemische Zusammensetzung:

C	40,26 %
H	4,06 %
N	14,23 %
O	40,45 %

Also keine Ähnlichkeit mit der Zusammensetzung der Eiweißkörper.

Wie gelangt man nun von einer kolloidalen Kohlenhydratkette zu Körpern, die alle Eigenschaften und die prozentische Zusammensetzung der Eiweißsubstanzen aufweisen?

Die Antwort lautet: Man bindet die Eiweißspaltungsprodukte unter Wasseraustritt an die Kohlenhydratkette. Verfasser hat schon des öfteren darauf aufmerksam gemacht, daß bei aller Mannigfaltigkeit des Chemismus der Organismen eine Reaktion als Schema aller Synthesen und Spaltungen genügt, wenn von Oxydation und Reduktion während der Spaltung und Synthese abgesehen werden soll; bei jeder solchen Reaktion tritt H^+ und OH^- in ein Molekül, dann haben wir Spaltung, oder es tritt $H^+ + OH^-$ aus zwei Molekülen aus, dann haben wir Synthese.

Lassen wir aus der Kohlenhydratkette die OH^--Gruppen austreten, aus den Eiweißspaltungsprodukten ebensoviel H^+ aus Amidogruppen, soweit die Spaltungsprodukte solche besitzen, so resultiert ein Körper, der der Fermentspaltung zwei ganz verschiedene Angriffspunkte aufweist. Erstens die Stellen der Kuppelung zweier Sechszucker, die wenig zahlreich sind und bei ihrer Sprengung große komplizierte Gruppen zurücklassen, und zweitens die Stellen, an denen zwei Kohlenstoffatome durch N verbunden sind. Bei Sprengung dieser Stellen

durch Eintritt von H^+ und OH^- resultieren nur kleinere Bruchstücke.

Bemerkenswert erscheint es dem Verfasser, daß man die tatsächlich beobachteten Spaltungsprodukte der Eiweißkörper so wählen kann, daß durch ihre Bindung unter Wasseraustritt an eine kolloidale Kohlenstoffkette die prozentische Zusammensetzung der Eiweißkörper erreicht wird.

Gefrierpunktsmessungen hatten dem Verfasser ergeben, daß der löslichen Stärke ein Molekül, aus mindestens 10 Zuckerresten bestehend, zukommen muß, vielleicht ist das Molekül auch noch größer.

Für die Biuretreaktion sorgt die große Zahl von durch N verbundenen aminogruppenhaltigen Kohlenstoffatomen, die Xanthoproteinprobe beruht auf der Umwandlung aromatischer Komplexe in gelbgefärbte Nitroderivate, muß also positiv ausfallen, desgleichen die Millonsche Reaktion, die durch das Tyrosin hervorgerufen wird.

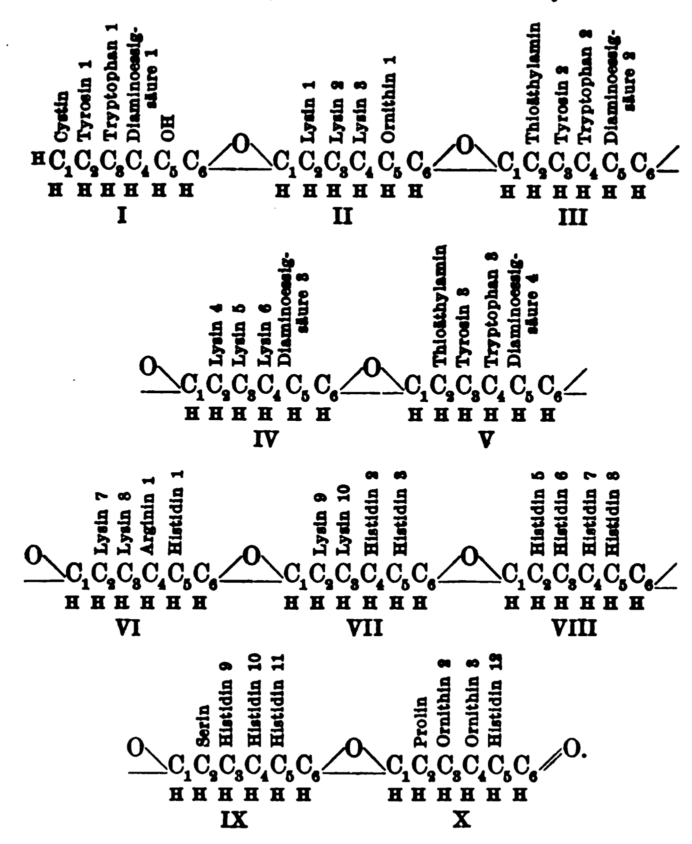
Die Schwefelbleiprobe, durch das Cystin veranlaßt, müßte schwer und leicht abspaltbaren Schwefel nachweisen, wie bei den Eiweißkörpern; durch die Anwesenheit von Tryptophan müßte auch die Probe nach Adamkiewicz positiv ausfallen. Die Proben von Molisch und Liebermann wurden schon früher auf Anwesenheit eines Kohlenhydratkomplexes im Eiweiß bezogen, es genügt wahrscheinlich, wenn nicht alle OH^--Gruppen des kolloidalen Komplexes ersetzt sind. Vier der OH^--Gruppen der Stärke durch Essigsäurereste zu ersetzen, ist synthetisch bereits gelungen[1]), welche Schwierigkeiten die Veresterung mit Amino- und Diaminosäuren bietet, müßten erst Versuche entscheiden.

Werden in einer kolloidalen Kohlenhydratkette nicht alle OH^--Gruppen, sondern nur ein Teil ersetzt, so berechnen sich Substanzen, die die prozentische Zusammensetzung der Glykoproteide erkennen lassen.

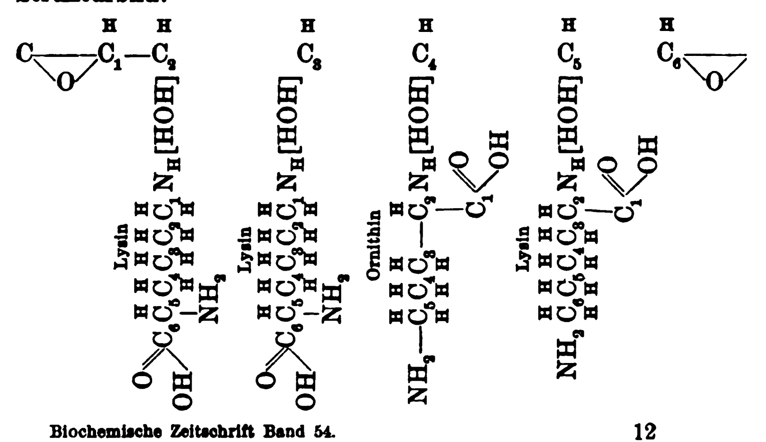
Zum Schluß möge die Formel eines Komplexes von zehn Zuckern ihren Platz finden, in denen, wie oben angegeben, die OH^--Gruppen sämtlich durch Reste der Eiweißspaltungsprodukte unter Wasseraustritt ersetzt sind.

---

[1]) Bereits die Essigsäureester der Kohlenhydrate besitzen im Gegensatz zu den Zuckern bitteren Geschmack wie die Peptone.



Greifen wir einen Komplex heraus, z. B. Zucker II, um die Bindung der Diaminosäure zu zeigen, so entsteht das Strukturbild:



Dieses Strukturbild läßt erkennen, daß Aminogruppen und Säuregruppen sich gegenseitig in ihrem elektrischen Verhalten neutralisieren müssen. Die Gerinnung der Eiweißkörper wäre dann ein Zusammenschluß mehrerer Eiweißmoleküle durch gegenseitige Bindung von Amino- und Säuregruppen, die verschiedenen Eiweißmolekülen angehören.

Dieser Zusammenschluß muß in den natürlichen Lösungen von Eiweiß durch eine Art Wasserhülle um jedes Molekül verhindert werden, bei der Koagulation käme es dann zu einer Sprengung dieser Hüllen.

Das oben angegebene Strukturschema ist ganz besonders geeignet beim Unterricht, die physiologisch wichtigen Eigenschaften der Eiweißkörper anschaulich zu machen.

Nehmen wir eine Kette von 10 Traubenzucker weniger 9 Wasser und ersetzen die OH-Gruppen, 40 an der Zahl, durch die Eiweißspaltungsprodukte, so entstände ein Körper, bestehend aus:

1.	1 Stärkerest	10 ($C_6H_{12}O_6$)	— 9 H_2O.
2.	1 Cystin	1 ($C_6H_{12}N_2S_2O_4$)	— 1 H_2O Disulfid der Aminothiomilchsäure.
3.	2 Thioäthylamin[1]) .	2 ($C_2H_7N_1S_1$)	— 2 H_2O.
4.	3 Thyrosin.	3 ($C_9H_{11}NO_3$)	— 3 H_2O Paraoxyphenyl-α-aminopropionsäure.
5.	3 Tryptophan	3 ($C_{11}H_{12}N_2O_3$)	— 3 H_2O Indolaminopropionsäure.
6.	3 Diaminoessigsäure	3 ($C_2H_6N_2O_2$)	— 3 H_2O.
7.	20 Lysin	20 ($C_6H_{14}N_2O_2$)	— 20 H_2O α-ε-Diaminocapronsäure.
8.	1 Arginin	1 ($C_6H_{14}N_4O_2$)	— 1 H_2O Guanidin-α-aminovaleriansäure.
9.	2 Histidin	2 ($C_9H_9N_3O_2$)	— 2 H_2O.
10.	1 Serin.	1 ($C_3H_7NO_3$)	— 1 H_2O α-Amino-β-oxypropionsäure.
11.	3 Ornithin	3 ($C_5H_{12}N_2O_2$)	— 3 H_2O.
12.	1 Prolin	1 ($C_5H_2NO_2$)	— 1 H_2O α-Pyrrolidincarbonsäure.

[1]) Man nimmt jetzt allgemein an, daß der Schwefel nur als Cystinschwefel im Eiweiß vorhanden ist; die Eiweißkörper können darnach nur 2 oder 4, aber nicht 3 Schwefelatome im Molekül besitzen.

12 verschiedene Bausteine, im ganzen 41 Komplexe, die unter Wasseraustritt sich zu einer Kette binden.

Das Molekulargewicht beträgt von $C_{297}H_{509}N_{77}S_4O_{96}$ rund M = 6816. Die prozentische Zusammensetzung zeigt rund:

C	52,3 %
H	7,4 %
N	15,8 %
S	1,8 %
O	22,5 %.

Die Grenzen der Eiweißanalysen sind:

C	50,6	bis	54,5 %
H	6,3	„	7,3 %
N	15,0	„	17,6 %
S	0,3	„	2,2 %
O	21,5	„	23,5 %.

Durch Wassereintritt geht Zucker in einen siebenwertigen Alkohol über. Ersetzen wir in jedem Zuckermolekühl nicht 4, wie oben geschehen, sondern 5 OH durch Aminosäurereste, so resultiert z. B. eine Substanz, die völlig innerhalb der Grenzen der prozentischen Zusammensetzung der Eiweißkörper liegt.

1. Stärkerest $10(C_6H_{12}O_6) - 9H_2O$; 2. 1 Cystin; 3. 1 Thioäthylamin; 4. 5 Tyrosin; 5. 2 Tryptophan; 6. 3 Diaminoessigsäure; 7. 6 Glykokoll; 8. 15 Lysin; 9. 1 Arginin; 10. 3 Histidin; 11. 1 Serin; 12. 1 Prolin; 13. 2 Phenylalanin. Dies gibt 51 Bausteine, darunter 14 verschiedene, die unter Wasseraustritt sich zusammenschließen. Das Molekulargewicht der Substanz $C_{338}H_{543}N_{89}O_{109}S_3$ ist gleich 7685, die Zusammensetzung gleich rund:

C	52,7 %
H	7,1 %
N	16,2 %
S	1,2 %
O	22,7 %.

Eiweiß:

C	(50,6	bis	54,5 %)
H	(6,3	„	7,3 %)
N	(15,0	„	17,6 %)
S	(1,3	„	2,2 %)
O	(21,5	„	23,5 %),

also völlig innerhalb der Grenzen der Eiweißbefunde.

Fragen wir nach den voraussichtlichen Eigenschaften eines solchen Körpers, so werden wir sie völlig mit den bekannten Eigenschaften der Proteinsubstanzen übereinstimmend finden.

Da die Kohlenhydratkette bereits kolloidal ist, wird die Substanz erst recht kolloidal sein müssen. Ammonsulfat salzt Glykogen aus, also auch obige Substanz. Der chemische Charakter muß amphoter sein, wie bei den Eiweißkörpern, da sowohl $C\langle^{O}_{OH}$-Gruppen wie NH_2-Gruppen reichlich vorhanden sind. Die Spaltbarkeit in zwei Richtungen an der Stelle des Zusammenschlusses der ursprünglichen Zuckergruppen und an der Stelle der Veresterungen ist bereits oben erwähnt worden. Bei der Spaltung der O-Bindung resultieren 10 größere Moleküle, die teils schwefelhaltig, teils schwefelfrei sind und in ihrer Zusammensetzung wechseln. Bei der Spaltung der N-Bindungen resultiert eine größere Zahl kleinerer Moleküle: Aminosäuren, Diaminosäuren und Oxysäuren.

Die Farbenreaktionen, die für die Proteinsubstanzen charakteristisch sind, müssen sämtlich von obiger Substanz gezeigt werden.

Zu einer biologisch wichtigen Kenntnis der Eiweißkörper hätten die bisherigen Synthesen selbst dann nicht beigetragen, wenn die im Reagensglas unter Erhitzen dargestellten Substanzen völlig die Zusammensetzung der Eiweißkörper dargeboten hätten.

Wir brauchen nun nicht zu verlangen, daß die Synthese genau denselben Weg einschlägt, wie der lebendige Organismus, obwohl dies das Ideal darstellt; wohl aber müssen wir verlangen, daß wir die hauptsächlichsten biologischen Eigenschaften der Eiweißkörper aus dem Bau des synthetischen Produkts ableiten können. Die Eiweißkörper insgesamt haben die Eigenschaft, durch Pepsinsalzsäure in kleinere, aber noch eiweißähnliche Komponenten gespalten zu werden, und diese kleineren Komponenten werden in H^+-armer Lösung dann völlig in krystalloide Substanzen umgewandelt. Die Frage nach einem unverdaulichen Rest im Eiweiß soll hier nicht erörtert werden, da es recht wahrscheinlich ist, daß es während der Fermentwirkung zur Rückbildung größerer, sehr schwer spaltbarer Komponenten kommt in einzelnen Fällen, in denen ein solcher unverdaulicher Rest bei der Fermentspaltung beobachtet wird.

Emil Fischer nimmt nun an, daß die Verschiedenheit der Wirksamkeit von Trypsin-OH-Lösung und Pepsin-H^+-Lösung darauf beruht, daß erst längere Ketten von der Pepsin-H^+-Lösung gespalten werden, kürzere von der Trypsin-OH-Lösung.

Unsere bisherige Auffassung von der Wirkung der Fermente läßt es ebenso glaubhaft erscheinen, daß eine verschiedenartige Bindung die Ursache der verschiedenartigen Angriffsweise der beiden im ganzen Organismenreiche verbreiteten zwei Verdauungsfermente sein wird. Die Annahme eines kolloidalen Kohlenhydratkernes im Eiweißmolekühl zeigt nicht nur auf den ersten Blick die Ursache der verschiedenen Wirkung zweier Verdauungsfermente, sondern zeigt zugleich den tatsächlich beobachteten Charakter der Spaltungsprodukte. Große Moleküle von kompliziertem Bau nach der Spaltung im Sinne der früheren Zuckerkomplexe, Amidosäuren nach der Spaltung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff resp. Diamidosäuren, Kohlensäure und Ammoniak.

Nach dem heutigen Stande der Eiweißchemie ist es recht wahrscheinlich, auch für den Verfasser, daß die Mehrzahl der Eiweißkörper keine zentrale Kohlenstoffkette besitzt, sondern daß eine einfache kettenförmige Verknüpfung von Aminosäuren vorliegt. Verfasser glaubt trotzdem einer abweichenden Betrachtung eine erhebliche Wichtigkeit zuschreiben zu müssen, welche zu einer Synthese von interessanten Isomeren der Eiweißkörper führen kann, denen voraussichtlich sehr bald große pharmakologische Bedeutung zukommen würde.

Über die Beziehungen der Kohlensäurespannung des Blutes zur Lungenventilation.

Nach Versuchen von A. L. Sample (Baltimore) mitgeteilt

von

O. Porges.

(Aus der I. medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 7. Juli 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

Die Bestimmung der Kohlensäurespannung des Blutes hat in den letzten Jahren für Fragestellungen der Physiologie und Pathologie große Bedeutung erlangt. Porges, Leimdörfer und Markovici[1]) stellten nämlich auf Grund von Untersuchungen der verschiedenen Dyspnoeformen die Theorie auf, daß die Atmung in erster Linie der Regulation der Blutacidität dient, dergestalt, daß Vermehrung der fixen sauren Valenzen des Blutes das Atemzentrum zu größerer Tätigkeit reizt, was vermehrte Ventilation, vermehrte Ausfuhr der Kohlensäure des Blutes, damit vermehrte Entfernung saurer Valenzen und Wiederherstellung der neutralen Reaktion des Blutes zur Folge hat. Da die Kohlensäurespannung des Blutes ein Indicator der freien Kohlensäure ist, so gibt ihre Größe Auskunft über die Menge der fixen sauren Valenzen im Blute: Ist die Kohlensäurespannung herabgesetzt, so kann man dieser Theorie zufolge auf eine Vermehrung der fixen sauren Valenzen schließen. Demgemäß haben Porges, Leimdörfer und Markovici[2]) aus einer herabgesetzten Kohlensäurespannung bei pathologischen Fällen auf die Gegenwart von abnormen sauren intermediären Produkten oder auf die Retention von sauren Stoff-

[1]) Wiener klin. Wochenschr. **1910**, Nr. 40.

[2]) Zeitschr. f. klin. Med. **73**, 389, 1911.

wechselschlacken geschlossen. Gegen die Berechtigung derartiger Schlußfolgerungen wendet sich nun Hasselbalch[1]), indem er geltend macht, daß für die Tätigkeit des Atemzentrums und damit für den Umfang der Ventilation und die Kohlensäurespannung nicht nur die Reizgröße, sondern auch die Erregbarkeit des Atemzentrums von Bedeutung ist. Bei gesteigerter Erregbarkeit könnte trotz normaler Reizgröße eine herabgesetzte Kohlensäurespannung resultieren. Lindhard hat nun eine Methode der Erregbarkeitsprüfung ausgearbeitet, die, von Hasselbalch in einem konkreten Falle von herabgesetzter Kohlensäurespannung angewendet, eine erhöhte Erregbarkeit ergab. Es handelte sich um herabgesetzte CO_2-Spannung in der die Gravidität, die unabhängig von Hasselbalch[2]) auch von Leimdörfer, Novak und Porges[3]) gefunden und auf Retention saurer Substanzen im Blute bezogen worden war. Das Verfahren von Lindhard[4]) ist eine Modifikation einer von Zuntz und Cohnstein angegebenen und von A. Löwy genauer ausgearbeiteten Methode. Es wird untersucht, in welchem Verhältnis eine Erhöhung der CO_2-Spannung zu der durch sie erzeugten Steigerung der alveolaren Ventilation steht. Lindhard bestimmt zunächst die alveolare Ventilation (d. i. die tatsächliche Ventilation vermindert um das Volumen des schädlichen Raumes) bei Atmung atmosphärischer Luft, sowie die gleichzeitig bestehende CO_2-Spannung, hierauf die alveolare Ventilation bei Atmung eines Gasgemenges mit einem bestimmten CO_2-Gehalt und die CO_2-Spannung nach dieser Einwirkung. Durch die Atmung des CO_2-reichen Gasgemenges steigt sowohl die alveolare Ventilation, als auch die CO_2-Spannung der Alveolarluft. Der Zuwachs der CO_2-Spannung ist ein Maß des Reizzuwachses, die Steigerung der alveolaren Ventilation ein Maß der Reaktion des Atemzentrums auf diesen Reizzuwachs, das Verhältnis beider gibt ein Bild der Reizbarkeit des Atemzentrums.

Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens ist jedoch an die Voraussetzung geknüpft, daß derselbe Reizzuwachs immer die-

[1]) Diese Zeitschr. 46, 403, 1912.

[2]) Skandin. Arch. f. Physiol. 27, 1, 1912.

[3]) Zeitschr. f. klin. Med. 75, 301, 1912.

[4]) Journ. of Physiol. 42, 337, 1911.

selbe Ventilationsvermehrung erzeugt, unabhängig von der absoluten Größe des bereits vorhandenen Reizes, oder mit anderen Worten, daß die Reaktion auf den Reiz proportional mit dem Reize wächst. Daß die Voraussetzung für die Reaktionsfähigkeit nervöser Organe nicht generell zutrifft, zeigt das Weber-Fechnersche Gesetz. Es ergibt sich nun die Frage, wie die Reaktionsfähigkeit speziell des Atemzentrums von der Reizgröße beeinflußt wird. Auf diese Frage geben Hasselbalchs eigene Versuche eine Antwort. Sie zeigen, daß die Ventilationssteigerung auf einen bestimmten Reizzuwachs um so größer ist, je stärker bereits der Reiz war, auf den der Reizzuwachs superponiert wurde. Hasselbalch[1]) selbst illustriert das Verhältnis von Reizzuwachs und Ventilationssteigerung durch nebenstehende Kurve.

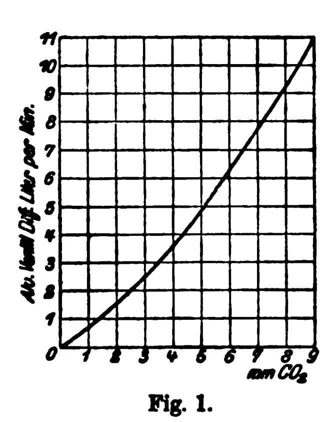


Fig. 1.

Die Zeichnung zeigt, daß dem Reizzuwachs von 1 mm CO_2-Spannung im Anfangsteile der Kurve eine Ventilationssteigerung von weniger als 1 l entspricht, im Endteil von fast 2 l. Die Kurve ist demnach keine Gerade, wie es die Anwendbarkeit des Lindhardschen Verfahrens erfordern würde, sondern eine zur Ordinate konkave Linie. Wenn nun schon von vornherein ein größerer Reiz besteht, dann befinden wir uns bereits zu Beginn im Endteil der Kurve, dann erzeugt ein Reizwachs eine größere Ventilationssteigerung als in Fällen, in denen der Atemreiz von vornherein geringer ist. Eine herabgesetzte Kohlensäurespannung wäre nun nach der oben erwähnten Theorie ein Zeichen einer bestehenden Acidosis, somit eines höheren Atemreizes. In Fällen von Acidosis muß somit derselbe Reizzuwachs eine größere Ventilationssteigerung zur Folge haben als in der Norm. Wenn daher Hasselbalch in der Gravidität scheinbar eine erhöhte Erregbarkeit des Atemzentrums findet, so läßt sich diese Erscheinung als eine Folge der Acidosis, als ein Ausdruck eines bereits bestehenden

[1]) Skand. Arch. f. Physiol. 27, 8, 1912.

höheren Atemreizes deuten. Die Richtigkeit dieser Deutung läßt sich experimentell beweisen: Es muß auch bei andersartig bedingten Zuständen von Acidosis mit dem Lindhardschen Verfahren scheinbar eine erhöhte Erregbarkeit des Atemzentrums gefunden werden. Zu diesen Versuchen wurde die diabetische Acidosis sowie die Acidosis bei Kohlenhydratabstinenz herangezogen.

In der Methodik wurde im großen und ganzen die von Lindhard angegebene Versuchsanordnung befolgt, nur wurde die CO_2-Spannung nicht nach Haldane sondern nach Plesch bestimmt. Weiter wurde auf die Ermittelung der alveolaren Ventilation verzichtet und nur die tatsächliche Ventilation bestimmt, da auch diese über die vorliegende Frage hinreichend Auskunft gibt. Im einzelnen gestaltete sich der Versuch folgendermaßen: Ein Hahn mit mehrfacher Bohrung verband zunächst ein Zuntzsches Mundstück mit dem Inspirationsrohr, das durch ein Zuntzsches Ventil das Gasgemenge der Inspirationsluft zuführte, sowie mit dem Exspirationsrohr, das durch ein Zuntzsches Ventil zur Gasuhr führte, die die Größe der Ventilation abzulesen gestattete. Durch eine Hahndrehung konnte In- und Exspirationsrohr ausgeschaltet, dagegen ein Gummisack mit dem Mundstück in Verbindung gesetzt werden, der die Bestimmung der CO_2-Spannung nach Plesch in der von Porges, Leimdörfer und Markovici beschriebene Weise ermöglichte. Es wurde zunächst ca. 10 Minuten atmosphärische Luft geatmet, dann die Bestimmung der CO_2-Spannung unmittelbar angeschlossen. Hierauf wurde ca. 5 Minuten eine mit $5^0/_0$ CO_2 versetzte Atmosphäre eingeatmet und wiederum unmittelbar darauf die CO_2-Spannung bestimmt. Die Versuche hatten das in folgenden Tabellen verzeichnete Ergebnis.

Zunächst zeigt die Untersuchung zweier normaler Personen (Tab. I) in Übereinstimmung mit den Erfahrungen Lindhards sowie Hasselbalchs einen Anstieg der Ventilation von ca. 6 l auf 10 bis 14 l nach Atmung von $5^0/_0$ Kohlensäure. Der Anstieg der alveolaren CO_2-Spannung bewegt sich dabei zwischen 0,8 und $1{,}18^0/_0$ einer Atmosphäre.

Die Untersuchung eines Falles von Diabetes gravis (Tab. II) zeigt zunächst bei hochgradiger Acidosis eine CO_2-Spannung von entsprechend $3{,}6^0/_0$ einer Atmosphäre, was gegenüber der Norm ($5^1/_2$ bis $7^0/_0$) eine hochgradige Herabsetzung bedeutet.

Tabelle I.

Name	Datum	CO_2 i. d. inspir. Luft %	Ventil. pro Min. l	CO_2-Spannung % einer Atmosph.	Atemzüge pro Min.	Anmerkung
Herr X.	16. II.	0	5,0	6,04	14	Geheilter Diabetes Keine Acidosis
	do.	4,92	9,5	6,92	18	
„	17. II.	0	5,2	6,15	14	
	do.	4,89	10,2	6,98	16	
Herr C.	19. II.	0	7,0	5,82	16	Marschhämoglobinurie
	do.	5,02	12,0	6,92	16	
„	20. II.	0	7,5	6,41	16	
	do.	4,96	13,4	7,25	18	
„	21. II.	0	6,4	6,61	14	
	do.	5,06	14,2	7,79	18	
Frau S.	23. II.	0	7,6	4,22	18	Diabetes mellitus Aceton + Acetessigs. +
	do.	4,90	21,85	5,32	24	
„	24. II.	0	6,4	4,95	20	
	do.	4,98	18,0	5,70	28	

Tabelle II.
Patientin E. K.; Diabetes gravis.

Vers.-Zahl	Datum	CO_2 i. d. inspir. Luft %	Ventil. pro Min. l	CO_2-Spannung % einer Atmosph.	Atemzüge pro Min.	Harnbefund	Diät und Therapie
1	6. III. a. m.	0	7,8	3,60	16	Aceton +++ Acetessigs. +++	Strenge Diät
	do.	4,86	18,5	4,95	24	do.	do.
2	6. III. p. m.	0	6,6	3,43	14	do.	do.
	do.	4,82	19,5	5,06	22	do.	do.
3	7. III. a. m.	0	6,4	3,52	16	do.	Strenge Diät 60 g Natr. bicarb.
	do.	4,94	18,2	5,10	24	do.	do.
4	7. III. p. m.	0	7,2	4,02	12	do.	do.
	do.	4,98	16,8	5,14	18	do.	do.
5	8. III.	0	7,4	3,80	14	do.	Strenge Diät 80 g Natr. bicarb.
	do.	4,85	17,2	4,98	16	do.	do.
6	10. III.	0	6,3	5,03	12	Aceton +++ Acetessigs. +	do.
	do.	4,90	12,8	6,38	16	do.	do.
7	11. III.	0	7,3	6,13	12	do.	Strenge Diät 100 g Natr. bicarb.
	do.	4,95	12,0	7,36	16	do.	do.
8	12. III.	0	7,0	6,08	14	Aceton + Acetessigs. 0	do.
	do.	4,97	12,1	7,22	18	do.	do.
9	13. III.	0	7,4	4,00	14	do.	Gemischte Kost Keine Soda
	do.	4,95	16,2	5,06	20	do.	do.
10	14. III.	0	7,2	4,12	12	do.	do.
	do.	4,92	15,9	5,28	18	do.	do.

Tabelle III.

Patientin Sw.; Graviditas.

Vers.-Zahl	Datum	CO_2 i. d. inspir. Luft %	Ventil. pro Min. l	CO_2-Spannung % einer Atmosph.	Atemzüge pro Min.	Harnbefund	Diät und Therapie
1	24. II.	0	7,6	4,54	12	Aceton + Acetessigs. +	Strenge Diät
	do.	4,90	20,0	5,86	24	do.	do.
2	25. II.	0	8,0	4,80	16	do.	Strenge Diät 100 g Traubenzuck.
	do.	5,10	19,7	5,92	20	do.	do.
3	26. II.	0	7,2	5,22	16		do.
	do.	4,95	18,0	6,04	22		do.
4	27. II. a.m.	0	6,8	4,90	20		do.
	do.	5,12	14,0	5,60	26		do.
5	27. II. p.m.	0	8,0	4,89	20		do. 30 g Natr. bicarb.
	do.	5,04	12,8	5,57	26		do. do.
6	28. II.	0	7,5	5,79	16	Aceton Spur Acetessigs. 0	Gemischte Kost 30 g Natr. bicarb.
	do.	4,96	11,0	6,55	24	do.	do.
7	1. III.	0	7,2	5,86	18		do.
	do.	4,92	10,8	6,60	24		do.

Die Erregbarkeitsprüfung nach Lindhard ergibt einen Anstieg der Ventilation von 7,8 l auf 18,5 l bei einer Erhöhung der CO_2-Spannung um 1,35% einer Atmosphäre. Ähnliche Zahlen ergeben sich bei der weiteren Untersuchung derselben Person. Nunmehr wird Natr. bicarbon. zugeführt, was nach den Untersuchungen von Porges, Leimdörfer und Markovici[1]) mit Beseitigung der Acidosis einen Anstieg der CO_2-Spannung zur Folge haben muß. Tatsächlich erhebt sich die CO_2-Spannung auf 6%. Die Erregbarkeitsprüfung nach Lindhard ergibt aber nur mehr einen Anstieg der Ventilation auf 12 l, sobald durch Atmung 5%iger Kohlensäure die Kohlensäurespannung um 1,23% einer Atmosphäre hinaufgetrieben wird. Demnach hat die Zufuhr von Alkalien scheinbar die Erregbarkeit des Atemzentrums hochgradig herabgesetzt. Nach Wegfall der Alkalizufuhr sinkt die CO_2-Spannung wieder auf 4%, die Erregbarkeitsbestimmung ergibt wieder einen Anstieg auf 16 l Ventilation bei Steigerung der CO_2-Spannung um 1,06% einer Atmosphäre. Somit hat die diabetische Acidosis schein-

[1]) l. c.

bar eine Erhöhung der Erregbarkeit des Atemzentrums zur Folge.

Ein analoges Resultat ergibt die Untersuchung eines andern Patienten mit diabetischer Acidosis (Tab. I). Schließlich wurde eine gravide Frau untersucht, bei der durch kohlenhydratfreie Kost eine Acidosis erzeugt worden war (Tab. III). Sie zeigt eine herabgesetzte CO_2-Spannung von 4,54%; Atmung 5%iger Kohlensäure steigert die Ventilation auf 20 l, während die CO_2-Spannung um 1,32% einer Atmosphäre hinaufgetrieben wird. Durch Darreichung von Kohlenhydraten und Alkalien steigt hierauf die CO_2-Spannung allmählich auf 5,86%, die Erregbarkeitsprüfung ergibt nunmehr einen Anstieg der Ventilation bloß auf 10,8 l bei Steigerung der CO_2-Spannung um 0,74% einer Atmosphäre: Es war demnach gelungen, durch Zufuhr von Alkalien und Kohlenhydraten die scheinbar erhöhte Erregbarkeit auf die Norm zu reduzieren.

Unsere Versuche zeigen demnach, daß die Lindhardsche Versuchsanordnung nicht geeignet ist[1]), über die Erregbarkeit des Atemzentrums Aufschluß zu geben, wie man ja auch bekanntermaßen die Erregbarkeitsprüfung anderer nervöser Organe nicht in analoger Weise anstellen darf. Den Befund einer herabgesetzten CO_2-Spannung darf man daher ungeachtet dem Einspruche Hasselbalchs im Sinne von Porges, Leimdörfer und Markovici als Zeichen einer Acidosis deuten. Übrigens schlägt Hasselbalch selbst den Einfluß, den eventuell eine veränderte Erregbarkeit des Atemzentrums haben mag, in einer späteren Arbeit nicht hoch an; er glaubt, daß er praktisch eine Breite von 5 mm nie überschreitet. In den Arbeiten von Porges, Leimdörfer und Markovici handelt es sich aber um Ausschläge, die diesen Spielraum weit überschreiten.

[1]) Von diesem Vorwurf wird die ursprüngliche Methodik Löwys nicht getroffen, da dieselbe andere Kriterien wählt.

Über die Ausscheidung der Ameisensäure im menschlichen Urin in physiologischen und pathologischen Zuständen.

Von

Rudolf Strisower.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Universität in Wien.)

(Eingegangen am 7. Juli 1913.)

I. Einleitung.

In der Literatur findet man nur wenige Angaben über den Ursprung und die Entstehungsursachen der niederen, flüchtigen Fettsäuren des menschlichen Urins, insbesondere der Ameisensäure. Die wenigen Untersuchungen über die Quantität der Ameisensäureausscheidung differieren schon in der Norm oft um das Zehnfache; noch divergenter sind die Angaben der Autoren über die pathologischen Zustände, in denen eine Vermehrung der flüchtigen Säuren zu finden ist, weshalb die aus derartigen Untersuchungen gezogenen klinisch-diagnostischen Schlüsse sich oft widersprechen. Die Gründe hierfür sind verschiedenartig. Zunächst ist eine Anzahl von Arbeiten ganz auszuschalten, weil sie mit einer unzureichenden Methode ausgeführt sind, weiter fehlen systematische Untersuchungen über die Beeinflussung der Ausscheidung der flüchtigen Säure durch physiologische Momente, wie Bewegung, Diätformen usw. Schließlich sind meist die gesamten flüchtigen Fettsäuren als einheitliches Ganzes behandelt und bestimmt, während doch die Möglichkeit vorliegt, daß Abnahme der einen Säure die Zunahme einer anderen verdeckt. Es schien daher eine dankbare Aufgabe, zunächst die Ausscheidungsverhältnisse einer der Fettsäuren zu untersuchen, für die eine exakte Bestimmungsmethode existiert. Es wurde deshalb die Ameisensäure gewählt, ihre Elimination im menschlichen Urin in einer Reihe von systematischen Untersuchungen verfolgt, die Beeinflussung derselben

durch physiologische Momente festgestellt, dann nach Ermittelung der Krankheiten, die zu einer vermehrten Ausscheidung der Ameisensäure führen, ihre Stellung in der Physiologie und Pathologie des Stoffwechsels erschlossen.

Wir lassen zunächst eine kurze Übersicht der Literatur folgen, die sich auf die Bildung und Ausscheidung der Ameisensäure bezieht:

Als normaler Bestandteil des Harnes wurde die Ameisensäure von Thudichum[1]) als Erstem entdeckt, der die physiologischerweise ausgeschiedene Säure auf 50 mg im Tag schätzt.

v. Jaksch[2]) stellte Untersuchungen über die Abstammung der flüchtigen Fettsäuren, hauptsächlich der Essig- und Ameisensäure, an. Er vermutete, daß analog einer Acetonurie eine Lipacidurie vorkommt. Die Essigsäure und Ameisensäure entstehe durch Spaltung des Acetons, letzteres sei ein Spaltprodukt des Eiweißstoffwechsels. Im normalen nativen Harn wird nach Jaksch Ameisensäure und Essigsäure in der Menge von höchstens 8 mg im Tag ausgeschieden; im Fieber steigt sie auf 60 mg, bei hepatogener Lipacidurie sogar auf 600 mg und darüber. Diese Tatsache bringt er in Beziehung zur gestörten Harnstoffbildung, da mit dem Sinken der Harnstoffausscheidung Fettsäuren in bedeutender Menge auftreten.

Rokitansky[3]) sieht die Kohlenhydrate als Muttersubstanz der Fettsäuren an und stellt sich vor, daß sie im Darmkanal durch Fäulnis der Kohlenhydrate entstehen. Als Beweis führt er an: 1. die Vermehrung der flüchtigen Säuren im Fieber, indem während des Fiebers durch Liegenbleiben der Darmcontenta Gelegenheit zur Resorption der Fettsäuren geboten wird; 2. die Vermehrung der Fettsäuren, besonders der Buttersäure, nach reichlicher Ernährung mit Kohlenhydraten.

Diese Ansicht teilt auf Grund seiner Versuche auch Blumenthal[4]), der hohe Fettsäurezahlen bei Zulage von 50 g Tropon, Nutrose, Milchzucker oder von 1 l Milch zur Normalkrankenkost fand. Auch er bringt die hohen Fettsäurewerte bei Krankheiten wie jauchige Peritonitis, Angina usw. zu Fäulnisprozessen im Körper in Beziehung.

Dieselbe Ursache für die vermehrte Ausscheidung flüchtiger Säuren im Urin bei Obstipation, Bleikolik, Leberkrankheiten nehmen Strauß und Philippsohn[5]) an. Dagegen gelang es ihnen nicht, nach Zulage von 100 g Traubenzucker zur gemischten Kost oder durch Zufuhr von

---

[1]) Thudichum, Über Essig- und Ameisensäure im Menschenharn. Arch. f. d. ges. Physiol. 15, 129, 1877.

[2]) v. Jaksch, Über physiologische und pathologische Lipacidurie. Zeitschr. f. physiol. Chem. 10, 536, 1886.

[3]) Rokitansky, Über das Verhalten flüchtiger Säuren im Urin. Wiener med. Jahrb. 1886, 206.

[4]) Blumenthal, Verhdl. d. Charitéärzte. Berl. klin. Wochenschr. 1899, 843.

[5]) Strauß und Philippsohn, Zeitschr. f. klin. Med. 40, 369, 1900.

20 g buttersaurem Natrium eine Erhöhung der niederen Fettsäuren im Urin nachzuweisen.

Endlich wäre noch Rosenfeld[1]) zu erwähnen, der die Bildung der flüchtigen Fettsäure in den Darm oder in die Gewebe verlegt, wo es pathologischerweise zur Fäulnis kommen kann, z. B. bei Eiterungen und Blutungen, also bei Angina lacunaris, Tonsillarabsceß, septischer Diphtherie, Empyem usw. Nach seiner Ansicht bilden die Fäulnisbakterien so viel flüchtige Fettsäuren, daß der Organismus dieselben nicht mehr zu oxydieren vermag.

Wie aus der kurzen Zusammenstellung ersichtlich, handelte es sich in den zitierten Arbeiten um alle flüchtigen Fettsäuren: also um Butter-, Propion-, Essig-, Ameisensäure. Die Angaben über die Ausscheidung der Ameisensäure allein sind viel spärlicher und beziehen sich hauptsächlich auf Tierexperimente.

So fand Pohl[2]) beim Hunde nach Darreichung von Methylalkohol protrahierte Ausscheidung von Formiat; auch beim Menschen konnte er eine gesteigerte Ausfuhr von Ameisensäure nach Methylalkoholdarreichung zeigen.

Dakin macht in einer kurzen Publikation die Angabe, daß bei Diabetes die 10fache Menge der normalen Ameisensäure gefunden wird.

Als die vorliegende Arbeit bereits abgeschlossen war[3]), erschien eine weitere Publikation von Dakin[4]), in der er angibt, ca. 60,3 mg Ameisensäure im normalen Urin des Menschen gefunden zu haben. Bei Kohlenhydratnahrung zeigt nach seinen Versuchen die Ameisensäureausscheidung einen Anstieg (35 bis 175 mg, durchschnittlich 96 mg gegen 84,6 bis 99 mg, im Durchschnitt 67 mg bei Eiweißernährung. Bei Tieren im Hunger fand dieser Autor durchschnittlich 8,9 mg; bei Kartoffelkost steigt die Menge auf 51 mg, bei Fleischkost auf 27 mg. Daß die Darmfäulnis nicht an dieser Vermehrung schuld ist, zeigt die Steigerung der Ameisensäure nach intravenöser Injektion von Glucose. Nach Fettsäureverfütterung (Essig-, Propion-, Butter-, Glykolsäure, nach Glykokoll, Asparagin, Alanin) findet er bloß die 3 bis 4fache Menge der normalen Ameisensäure.

Der Vollständigkeit halber sind noch C. Lenoble, Kluger[5]),

---

[1]) J. Rosenfeld, Die Ausscheidung flüchtiger Säuren durch den Harn. Deutsche med. Wochenschr. **1903**, 224.

[2]) Pohl, Über Oxydation des Methyl- und Äthylalkohols im Tierkörper. Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **31**, 281, 1893.

[3]) Die Resultate dieser Arbeit wurden als vorläufige Mitteilung in der Gesellschaft der Ärzte am 18. April vorgetragen. Siehe Wiener klin. Wochenschr. **1913**, Nr. 17.

[4]) Dakin Janney Wakeman, Studies on the conditions affecting the formation and excretion of formic acid. The estimation of formic acid in urine. Journ. of Biolog. Chem. **14**, Nr. 4, S. 341.

[5]) Kluger, Über Säuren des diabetischen Harnes. Annal. d. Chem. **106**, 19.

Jakubasch[1]), Scherer[2]) zu erwähnen, die bei einzelnen Untersuchungen (Diabetes, Leukämie) vermehrte Ausscheidung der Ameisensäure — genaue quantitative Angaben fehlen — gefunden haben.

Die nachfolgenden Versuche, die 1. die normalerweise ausgeschiedene Ameisensäuremenge, 2. die Beeinflussung der Ausscheidung derselben durch physiologische Momente, wie Bewegung, Kostform usw., 3. das Verhalten derselben bei verschiedenen Erkrankungen betreffen, wurden mit folgender Methode ausgeführt, die sich nach längeren Vorversuchen als zweckentsprechend erwies.

II. Methodik.

Ein aliquoter Teil — durchschnittlich 400 bis 800 ccm — des 24stündigen, durch Borsäure konservierten Urins wurde mit konzentrierter Phosphorsäure bis zur blauen Färbung des Kongopapiers versetzt, wozu in der Regel 10 bis 15 ccm konzentrierte Phosphorsäure notwendig waren. Der Urin wurde nun bei einem Druck von 15 bis 25 mm Hg und einer Innentemperatur von 22 bis 30° in eine Vorlage, in der sich 5 bis 10 ccm 10°/₀ige Natronlauge befand, überdestilliert. (Die Destillation im Vakuum bei niederer Temperatur ist notwendig, um die Zersetzung ev. im Urin vorhandener, bei hoher Temperatur flüchtige Fettsäuren abspaltender Substanzen zu vermeiden.) Das Destillat, in eine Porzellanschale quantitativ hinübergespült, wurde auf 40 bis 50 ccm am Wasserbade eingedampft, in ein Erlenmeyer-Kölbchen gebracht, mit verdünnter Salzsäure[3]) gegen Lackmus neutralisiert und noch 3 bis 4 Tropfen Salzsäure zugesetzt, um den Umschlag der neutralen in alkalische Reaktion durch Entweichen von Kohlensäure in der Wärme zu verhindern. Nach Zufügung von 50 bis 100 ccm einer Sublimatlösung nachstehender Zusammensetzung: 50 g Sublimat, 27,5 g Natriumacetat auf 1000 ccm destilliertes Wasser, wurde schließlich das Kölbchen für ca. 5 bis 6 Stunden in ein

---

[1]) Jakubasch, Virchows Archiv 43, 196, 1868.

[2]) Scherer, zit. nach Jakubasch.

[3]) Die hohen Ameisensäurewerte Dakins glaube ich auf die Neutralisation des eingeengten Destillates mit überschüssiger Essigsäure beziehen zu können. Meine ersten Versuche mußte ich aus demselben Grunde verwerfen. In einer soeben erschienenen Arbeit warnt Finke (diese Zeitschr. 51, 1913) vor jeglicher Verwendung von Essigsäure, weil bei einem Überschusse derselben erstens Quecksilberacetat ausfällt, zweitens im Handel eine ameisensäurefreie Essigsäure nicht erhältlich ist!

Tabelle I.

	Zusammensetzung und Menge der untersuchten Lösung	Kalomelmenge mg	Ameisensäuremenge mg	Ausbeute %
1.	0,25 g ameisensaures Natrium (Kahlbaum) mit 400 g Wasser destilliert	1,6798	0,2422 (als ameisensaures Natrium berechnet)	96,89
2.		1,6829	0,2427	97,00
3.		1,6720	0,2411	96,60
4.	0,25 g ameisensaures Natrium + 10 ccm β-Oxybuttersäure (Kahlbaum) + 15 ccm Aceton, mit 400 g Wasser destilliert	1,6980	0,2448	97,90
5.	0,13 g ameisensaures Natrium, mit 400 ccm Wasser destilliert	0,8700	0,1255	96,60
6.	10 mg ameisensaures Natrium = 6,7 mg Ameisensäure, mit 400 ccm Wasser destilliert	0,0620	0,00605 (Mittel 0,00617)	92,00
7.		0,0645	0,00629	
8.	10 mg ameisensaures Natrium = 6,7 mg Ameisensäure, ohne Destillation, 50 ccm destill. Wasser	0,0626	0,00610 (Mittel 0,00635)	95,00
9.		0,0679	0,00662	
10.	0,25 g ameisensaures Natrium + 25 ccm Serum, mit 400 ccm Wasser destilliert	1,6424	0,2370	93,20
11.	Urin des Patienten D., 700 ccm	0,0592	0,0058	
12.	7 g Lithiumlactat + 700 ccm Urin des Patienten D.	0,0512	0,0050	
13.	Urin des Patienten N., 500 ccm	0,1020	0,0099	
14.	5 ccm Milchsäure + 500 ccm Urin des Patienten N.	0,0850	0,0085	
15.	5 ccm β-Oxybuttersäure (Kahlbaum), mit 400 ccm Wasser destilliert	kein Niederschlag	—	
16.	Urin des Patienten S., 400 ccm	0,0348	0,0034	
17.	5 ccm β-Oxybuttersäure + 400 ccm Urin des Patienten S.	0,0410	0,0039	

kochendes Wasserbad gestellt, bis sich ein weißer, fester Kalomelniederschlag absetzte. Bis zum Sieden der Flüssigkeit muß man noch öfters ihre Reaktion prüfen, um ev. durch weiteren Zusatz einiger Tropfen verdünnte Salzsäure ein Um-

schlagen in alkalische Reaktion zu verhindern. Das Kalomel wurde nach dem Erkalten auf ein gewogenes Filter gebracht, vorher, falls eine flockige Verunreinigung auftrat, durch Zusatz konzentrierter Salzsäure gereinigt. Die gefundene Kalomelmenge, mit 0,0975 multipliziert, gibt die vorhandene Ameisensäure an. Die Brauchbarkeit der Methode ist aus der Tabelle I, in der die Kontrolluntersuchungen zusammengestellt sind, ersichtlich.

Die Ausbeute beträgt also 97 bis 98 % der zugesetzten Menge bei höherer Ameisensäuremenge, 92 bis 95 % bei ganz geringen, einige Milligramm betragenden Ameisensäuremengen. Besonders betonen möchte ich, daß die Anwesenheit von Serumeiweiß, Zucker, β-Oxybuttersäure, Aceton, Milchsäure, die Ameisensäurebestimmung mittels der Sublimat-Reduktionsmethode in quantitativer Hinsicht nicht beeinflußt. Dies schließt eine Formiatvermehrung infolge von Zersetzung der oben genannten Substanzen im Harn vollkommen aus.

Die mit dieser Methode ausgeführten Bestimmungen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Tabelle II.

Vers. Nr.	Name des Patienten	Krankheit	Ameisensäuremenge mg	Bemerkungen
1	S.	Cholelithiasis	5,6	Obstipation, Milchdiät.
2	P.	Nephritis	5,2	Bettruhe, kompensiert.
3	H.	Schwangerschaftsglucosurie	5,8	Strenge Diät. Zucker +, Aceton +.
4	Sch.	Vitium cordis	5,0	Bettruhe, Milchdiät.
5	K.	Polyglobulie	4,8	Temperatur 37,5°.
6	P.	Vitium cordis	5,8	Kompensiert, Bettruhe.
7	Sch.	Typhus abdominalis	wenig	Temperatur 38,5°, Obstipation.
8	T.	Ulcus ventriculi	do.	Bettruhe, Milchdiät, Obstipation.
9	S.	do.	do.	do.
10	Kr.	do.	do.	do.
11	B.	Ca. oesophagie	6,6	Bettruhe, Milchdiät.
12	K.	Diabetes mellitus	9,5	Zucker +, Aceton +, strenge Diät.
13	S.	Gesund	10,4	Gemischte Diät.
14	E.	Diabetes mellitus	9,8	Zucker 0, Aceton 0.
15	E.	do.	11,0	do.
16	S.	Gesund	11,6	Gemischte Diät.
17	D.	Vitium cordis	11,8	Kompensiert.
18	Sch.	Pneumonie	11,3	Krise 40°.
19	Sch.	Leukämie	10,8	Benzoltherapie, gemischte Diät.

Tabelle II (Fortsetzung).

Vers. Nr.	Name des Patienten	Krankheit	Ameisensäuremenge mg	Bemerkungen
20	Sch.	do.	12,6	Milchdiät, Bettruhe.
21	C.	Vitium cordis	9,6	Fleischdiät, wenig Beweg.
22	C.	do.	10,0	Gemischte Diät, Bewegung.
23	C.	do.	11,4	
24	M.	Diabetes mellitus	12,2	Bettruhe, Aceton 0.
25	L.	Adam-Stokes-Krankheit	12,5	Bettruhe.
26	D.	Vitium cordis	12,1	Fieber.
27	T.	Angina tonsillaris	13,3	Bettruhe, kompensiert.
28	D.	Vitium cordis	13,9	do.
29	D.	do.	16,4	Gemischte Diät.
30	D.	Gesund	13,7	10stündige Bergtour.
31	B.	do.	14,6	Gemischte Diät.
32	S.	do.	15,5	do.
33	L.	do.	15,8	Fieber 38,2°.
34	Sk.	Tbc. pulmonum	15,4	Bettruhe.
35	C.	Marschhämoglobinurie	15,2	Kein Anfall.
36	P.	Carcinomatose	16,8	Mäßige Bewegung.
37	S.	Vitium cordis	11,4	Bettruhe.
38	S.	do.	28,1	Bewegung.
39	Kl.	do.	12,1	Bettruhe.
40	Kl.	do.	32,2	Bewegung.
41	Kl.	Vitium cordis	34,4	Bewegung, gemischte Diät.
42	C.	do.	9,6	Bettruhe.
43	C.	do.	21,8	Bewegung.
44	J.	do.	15,2	
45	J.	do.	27,0	Bewegung.
46	Ca.	Marschhämoglobinurie	18,9	Anfall.
47	Ca.	do.	19,6	1. Tag nach dem Anfall.
48	Ca.	do.	14,6	2. Tag nachher.
49	Ca.	do.	24,0	Anfall.
50	Ca.	do.	79,8	do.
51	St.	Typhus abdominalis	24,1	Temperatur normal, gemischte Diät.
52	T.	Angina tons., Ulcus ventr.	22,6	Fleischdiät.
53	G.	Ca. pleural	18,2	Hochgradige Dispnoe.
54	S.	Vitium cordis	25,5	do.
55	Kl.	Tabes dorsalis	27,2	Bettruhe, Atropinbehandlg.
56	Kl.	Muskeldystrophie	37,0	Fleischdiät.
57	Kl.	do.	43,7	Kefirmilchdiät.
58	Kl.	Akute Leukämie	30,0	Dyspnoe.
59	W.	Leukämie	21,9	Thoriumbehandlung.
60	U.	do.	27,8	do.
61	M.	do.	38,9	do.
62	Br.	Diabetes mellitus	18,6	Aceton +.
63	E.	do.	13,3	do.
64	M.	Urämie	48,8	1. Tag.
65	M.	do.	100,0	4. Tag.
66	J.	Nephritis-Emphysem	98,9	Hochgradige Dyspnoe.
67	J.	do.	147,8	do.
68	W.	Vitium cordis	37,7	do.
69	W.	do.	71,7	do.
70	F.	Ulcus ventriculi	17,7	Milchdiät, Bettruhe.

Tabelle II (Fortsetzung).

Vers. Nr.	Name des Patienten	Krankheit	Ameisensäuremenge mg	Bemerkungen
71	A.	Vitium cordis	68,6	Dyspnoe.
72	K.	Diabetes mellitus	90,9	Aceton +.
73	E.	do.	97,2	do.
74	E.	do.	129,0	Oxybuttersäure, Aceton +.
75	E.	do.	226,8	do.
76	E.	do.	229,0	do.
77	K.	do.	145,1	Aceton +.
78	P.	Vitium cordis	192,1	Fleischdiät, Dyspnoe.
79	P.	do.	199,3	Gemischte Diät, Bettruhe, Dyspnoe.
80	P.	do.	392,6	Milchdiät, Dyspnoe.

Aus den angeführten Zahlen ist vor allem ersichtlich, daß die Ameisensäure in allen untersuchten Harnen gefunden worden ist, daß sie also einen normalen Bestandteil des Urins bildet.

Da ihre Menge bedeutende Schwankungen aufweist, müssen wir vorerst die Formiatmenge feststellen, die normalerweise ausgeschieden wird, um hernach die Bedeutung der vermehrten Formiatausscheidung würdigen zu können.

III. Ameisensäureausscheidung unter normalen Verhältnissen, ihre Beeinflussung durch physiologische Momente.

Zunächst war zu untersuchen, welche Menge von Ameisensäure unter normalen Verhältnissen, d. h. von einem gesunden Menschen bei mäßiger Bewegung und gemischter Diät ausgeschieden wird. Darüber gibt folgende Tabelle Aufschluß.

Tabelle III.

Name	Urinmenge		Kalomel	Ameisensäure		Bemerkungen
	24stündig	verarbeitet	mg	gefunden mg	auf 24 Std. berechnet mg	
Dr. L.	850	650	109,4	10,4	13,7	Gemischte Diät.
Dr. B.	1000	900	137,0	13,2	14,6	Mäßige Bergtour.
Dr. R.	1200	600	62,0	5,9	11,8	
Dr. S.	1300	650	219,6	20,9	41,8	Anstreng. Bergtour.
Rs.	1200	700	96,6	9,2	15,5	Gemischte Diät.
B.	1100	550	61,0	5,8	11,6	
S.	1400	700	83,0	7,9	15,8	3 g Urotropin zugef.
Dr. S.	1200	400	34,8	3,3	10,0	Gemischte Diät.

Es wurden also durchschnittlich 13,5 mg Ameisensäure im Urin gesunder, erwachsener Personen gefunden. Werte unter 10 mg sind als niedrig, über 17 mg als hoch zu betrachten.

Eine weitere Frage, die schon mit Rücksicht auf die vielen widersprechenden Angaben in der Literatur zu beantworten war, ist die Beeinflussung der Formiatausscheidung durch diätetische Maßnahme. Eigene Versuche beweisen, daß sowohl bei gemischter Kost (bestehend aus Milch, Semmeln, Butter zum Frühstück, aus Fleisch und Mehlspeise zu Mittag, Milchspeise zum Abendbrot), wie auch bei ausschließlicher Fleisch-Fetternährung oder absoluter Kohlenhydratkost die Ameisensäuremengen bedeutend schwanken können, ohne daß hierfür die Art der zugeführten Nahrungsmittel verantwortlich gemacht werden könnte.

Tabelle IV.

Versuch Nr.	Name und Krankheit	Urin		Kalomel	Ameisensäure		Bemerkungen
		24stündig	verarbeitet	mg	aus Kalomel berechnet mg	auf 24 Std. berechnet mg	
1	D., Vitium cordis	900	700	110,0	10,5	12,1	Milchdiät.
2	D., do.	1000	500	106,8	10,2	20,4	Fleischkost.
3	Kl., Muskelatrophie	1400	800	261,7	25,0	43,7	Kefirmilch 2 l.
4	Kl., do.	1200	800	258,0	24,7	37,0	Fleischkost.
5	T., Ulcus ventr.	600	500	wenig	—	—	Milchdiät.
6	T., do.	800	800	238,0	—	22,6	Fleischdiät.
7	T., Normal	1800	900	74,0	7,1	14,2	do.
8	T., do.	1600	800	114,0	10,9	21,8	Milchdiät.

Eine Beeinflussung der Formiatausscheidung durch Muskelarbeit ließ sich beim gesunden Menschen kaum nachweisen. So wurde nach einer ziemlich anstrengenden Bergtour (Besteigen der Raxalpe, 2000 m) keine Vermehrung der Ameisensäure gefunden (11,8 mg und 14,6 mg, siehe Tabelle III), nur ein einziges Mal nach einer anstrengenden 12stündigen Tour stieg die Ameisensäure auf 41,8 mg. Auch aus den weiter unten angeführten Tabellen ist ersichtlich, daß mäßige Bewegung keinen Einfluß auf die Ameisensäureelimination hat, ausgenommen dyspnoische Zustände, worüber noch ausführlich im Zusammenhang berichtet werden soll.

III. Ameisensäureausscheidung in pathologischen Zuständen.

Zunächst sollen alle Krankheiten mit normaler oder subnormaler Formiatausscheidung in einer Tabelle zusammengestellt werden.

Tabelle V.

Nr.	Name und Krankheit	Urinmenge in 24 Std.	Urinmenge verarbeitet	Kalomel mg	Ameisensäure aus Kalomel berechnet mg	Ameisensäure in 24 Std. mg	Bemerkungen
1	S., Cholelithiasis	1000	500	29,0	2,8	5,6	Atropintherapie, Obstipation, Milchdiät.
2	S., Ulcus ventriculi	1200	500	wenig	—	—	Obstipation, Milchdiät.
3	F., „ „	900	400	83,0	7,9	17,7	do.
4	H., Schwangerschaftsglucosurie	1000	500	30,1	2,9	5,8	Aceton +, 6 g Zucker.
5	S., Vitium cordis	900	300	18,0	1,7	5,1	Bettruhe, stenocardische Anfälle.
6	B., Adam - Stockes-Krankheit	1500	500	43,8	4,1	12,5	Bettruhe, keine Dyspnoe.
7	S., Typhus abdominalis	1500	500	wenig	—	—	Obstipation, Fieber 39°.
8	S., Pneumonie	750	500	78,3	7,5	11,3	Fieber 40°, Bettruhe.
9	S., Pneumonie caseosa	700	800	115,4	11,0	15,4	Septisches Fieber.
10	T., Tbc. d. Wirbelsäule	1800	550	61,9	5,9	13,3	Fieber, Bettruhe, Milchdiät.
11	P., Carcinomatose	1100	600	88,0	8,4	16,8	Diarrhöe.
12	B., Ca. Oesophagi	1800	600	23,0	2,2	6,6	flüssige Diät.
13	K., Polyglobulie	1200	500	25,0	2,4	4,8	Bettruhe, Fieber 37,7°.
14	S., Leukämie	1000	650	57,0	5,4	10,8	Benzolbehandlung.
15	S., do.	1300	700	65,8	6,3	12,6	Besserung nach Benzoltherapie.
16	P., Nephritis	2800	700	14,0	1,9	7,6	Bettruhe, keine Dyspnoe.
17	D., Vitium cordis	1850	800	51,0	4,8	12,0	Bewegung, keine Dyspnoe.
18	K., Diabetes	1200	450	66,0	6,3	9,5	Zucker +, Aceton 0.
19	C., Tabes dorsalis	900	—	143,0	13,6	27,2	Bettruhe, Haferdiät.

Einige Worte mögen die Tabelle erläutern. Bei vielen Krankheiten, wie Ulcus ventriculi, Carcinom, Cholelithiasis, bei kompensierten Vitien, Nierenerkrankungen ohne Herzinsuffizienz, bei Diabetes mellitus ohne Acidose, bei fieberhaften Erkrankungen wie Typhus abdominalis, Pneumonie, Angina tonsillaris, Tuberkulose, bei Blutkrankheiten wie Polyglobulie, Leukämie im Stadium der Besserung usw. wurden normale, manchmal sogar subnormale Ameisensäuremengen gefunden. Diese Beobachtungen gestatten eine Stellungnahme zu der Ansicht der früher zitierten Autoren (**Blumenthal**, **Levin**, **Roki**-

tansky, Rosenthal), der gemäß alle flüchtigen Säuren, also auch die Ameisensäure in größeren Mengen nur bei Gärungs- und Fäulnisprozessen im Körper entstehen sollen. Sie stützen ihre Auffassung auf die von ihnen beobachtete Vermehrung der flüchtigen Säuren 1. bei Kohlenhydratnahrung, 2. bei der Obstipation, die der Gärung der Kohlenhydrate Vorschub leistet, 3. bei septischen und eitrigen Prozessen im Körper (bei Fieber). Die sub 1 zitierte Tatsache konnte, wenigstens was die Ameisensäure betrifft, nicht bestätigt werden (siehe Tabelle IV). Aus der Tabelle V ist ersichtlich, daß weder Obstipation (Fall 1, 2, 3, 7) noch septische Prozesse, wie Angina tonsillaris, Pneumonia crouposa und caseosa (Fall 8, 9, 10) mit einer Vermehrung der Ameisensäureausscheidung einhergeht. Bei Carcinom, Ulcus ventriculi, für die ebenfalls eine Steigerung der flüchtigen Säuren infolge von Retention von Speisen im Magen angenommen worden ist, wurden normale, öfters auch subnormale Werte gefunden (Fall 1, 7, 8, 12).

Übersieht man nun die in der Tabelle II zusammengestellten hohen Ameisensäurezahlen, so ergibt sich, daß man in der scheinbaren Regellosigkeit einige pathologische Zustände herausgreifen kann, bei denen die Vermehrung der genannten Fettsäure konstant zu finden ist. Dazu gehören 1. Erkrankungen, die mit Dyspnoe einhergehen, 2. diabetische Acidosis, 3. Leukämien.

Die Auscheidungsverhältnisse der Ameisensäure bei den erstgenannten Zuständen ist aus der Tabelle VI ersichtlich, in der alle mit Herzdekompensation und kardialer Dyspnoe einhergehenden Erkrankungen angeführt sind.

Mit Ausnahme von 2 Fällen (8 und 21), wo besonders niedrige Werte gefunden worden sind, beträgt die Menge der ausgeschiedenen Ameisensäure bei dyspnoischen Vitien das Zwei- bis Zwanzigfache des Normalen. Besondere Aufmerksamkeit sei auf die Fälle 9 und 12 gerichtet, bei denen infolge von gleichzeitigen Lungenerkrankungen (Emphysem) sich zur kardialen pulmonale Dyspnoe gesellte, wodurch vielleicht die höchsten Ameisensäurewerte ihre Erklärung finden. Der sub 22 registierte Fall wurde in diese Tabelle aufgenommen, obzwar keine Herzinsuffizienz bestand, um zu zeigen, daß die pulmonale Dyspnoe allein durch einen Tumor der Pleura und Lunge bedingt,

Tabelle VI.

Nr.	Name und Krankheit	Urinmenge in 24 Std.	Urinmenge verarbeitet	Kalomel mg	Ameisensäure aus d. Kalomel berechnet mg	Ameisensäure in 24 Std. mg	Bemerkungen
1	J., Nephritis, Obesitas	2100	500	368,5	35,2	147,8	Bettruhe, starke Dyspnoe.
2	M., Nephritis	1000	500	255,3	24,4	48,8	Urämischer Anfall.
3	do.	1200	400	351,5	33,4	100,8	Chronische Urämie.
4	B., Aorteninsuff.	1300	500	151,8	14,5	37,7	Dyspnoe.
5	R., Vitium cordis	700	500	43,4	4,1	5,8	Dekompensation.
6	K., Mitralstenose	1800	500	107,9	10,3	37,1	Wenig dyspnoetisch.
7	S., Vitium cordis	1200	400	78,4	7,5	25,5	Dyspnoe.
8	S., Mitralvitium	300	900	18,0	1,7	5,1	Tachykardische Anfälle, Bettruhe.
9	J., Nephritis, Vitium cordis	2400	500	216,0	20,6	98,9	Dyspnoe, Milchdiät.
10	K., do.	1200	600	128,4	12,2	24,4	Bettruhe, gemischte Kost.
11	W., Aorteninsuff.	1200	400	250,5	23,9	71,7	3 g Urotropin verabreicht.
12	P., Vitium cordis	1150	500	880,0	84,0	199,3	Dyspnoe, gemischte Kost.
13	do.	1600	600	1069,6	124,5	392,6	Milchdiät, absolute Ruhe.
14	do.	850	500	1182,0	113,0	192,1	Fleischdiät, absolute Ruhe.
15	C., Vitium cordis	1000	500	60,0	5,7	11,4	Gemischte Diät, wenig gegangen.
16	do.	750	500	71,0	6,7	10,0	Fleischdiät, mäßige Bewegung.
17	D., Mitralvitium	900	800	17,0	10,5	12,1	Milchdiät, Ruhe.
18	do.	1000	500	106,8	10,2	20,4	Fleischdiät, Ruhe.
19	do.	1850	700	53,2	5,6	13,9	Gemischte Diät, Bewegung.
20	A., Myodegeneratio	3500	500	103,0	9,8	68,6	Starke Dyspnoe.
21	P., Vitium cordis	2800	700	14,0	1,9	5,2	Dyspnoe.
22	P., Ca. pleurae	800	500	119,6	11,4	18,2	Starke Dyspnoe.

genügt, eine Steigerung der Formiatausscheidung, wenn auch in geringem Maße, hervorzurufen.

Diese Beobachtungen führten zu einer Reihe von Versuchen, die die Vermutung, daß ein Zusammenhang zwischen der Dyspnoe und dem Anstieg der Ameisensäure bestehe, stützen sollte. Zu diesem Zwecke wurde der Urin von Patienten mit kompensierten Vitien, bei denen leicht eine Arbeitsdyspnoe hervorzurufen war, vergleichend einerseits bei absoluter Ruhe, andererseits nach mäßiger Bewegung untersucht. Die Versuche wurden in zweitägige Perioden eingeteilt (um eventuelle kleine Schwankungen, wie sie durch Nahrungsaufnahme, morgentliche Harnflut usw. bedingt werden könnten, nach Möglichkeit auszuschalten), derart, daß der Zeitperiode des ersten Tages, in der Bewegung ausgeführt wurde, am zweiten Tage Bettruhe entsprach, und umgekehrt.

Tabelle VII

Name und Krankheit	Zeit	Urin in der Zeit ausgeschieden	Urin verarbeitet	Kalomel gefunden mg	Ameisensäure aus Kalomel berechnet mg	Ameisensäure in 24 Std. mg	Bemerkungen	Ameisensäuremenge in 24 Std. bei Bettruhe	Ameisensäuremenge in 24 Std. bei Bewegung
	1. Tag								
S., Mitralvitium	6^h abends bis 6^h früh	1100	800	wenig, nicht gewogen			Bettruhe	wenig	
	6^h früh bis 12^h mittags	900	450	119,4	11,4	22,8	2^h Bewegung		22,8
	12^h mittags bis 6^h abends	700	700	85,0	8,1	8,1	Bettruhe	8,1	
	2. Tag								
	6^h abends bis 6^h früh	250	250	55,7	5,3	5,3	Am Abend nur wenig Bewegung, wegen Tachykardie		5,3
	6^h früh bis 12^h mittags	450	450	35,4	3,3	3,3	Bettruhe	3,3	
	12^h mittags bis 6^h abends	1000	1000	sehr wenig, nicht gewogen			Bloß aufgest., nicht gegang., wegen Herzbeschwerden	Summe 11,4	28,1
	1. Tag								
K., Mitralstenose	6^h abends bis 7^h früh	1400	700	59,0	5,6	11,2	Bettruhe	11,2	
	7^h früh bis 2^h nachm.	1000	500	137,5	13,1	26,2	$2^1/_2{}^h$ Bewegung		26,2
	2^h nachm. bis 6^h abends	425	425	wenig, nicht gewogen			Bettruhe	—	
	2. Tag								
	6^h abends bis 7^h früh	725	500	33,7	3,3	5,0	3^h Bewegung		5,0
	7^h früh bis 2^h nachm.	600	600	17,6	1,6	1,6	Bettruhe	1,6	1,0
	2^h nachm. bis 6^h abends	400	400	10,5	1,0	1,0	$1^1/_2{}^h$ Beweg., Herzbeschwerd.	Summe 12,8	32,2
	1. Tag								
C., Mitralvitium	6^h früh bis 2^h nachm.	250	250	167,0	15,9	15,9	2^h Bewegung		15,9
	2^h nachm. bis 7^h abends	250	250	30,0	2,8	2,8	Bettruhe	2,8	
	7^h abends bis 6^h früh	600	600	62,0	5,9	5,9	Wenig Bewegung am Abend		5,9
	2. Tag								
	6^h früh bis 2^h nachm.	350	350	40,2	3,8	3,8	Bettruhe	3,8	
	2^h nachm. bis 7^h abends	150	150	wenig, nicht gewogen			Keine Bewegung wegen Herzbeschwerden	3,0	—
	7^h abends bis 6^h früh	400	400	31,8	3,0	3,0	Bettruhe	Summe 9,6	21,8
C.[1]), Mitralvitium	24^h Urin	750	500	71,0	6,7	10,0	Bewegung, Fleischdiät	3,9	10,0
	do.	600	600	41,0	3,9	3,9	Bettruhe, Fleischdiät		
	do.	1000	500	60,0	5,7	11,4	Bewegung, gemischte Kost		11,4
J., Mitralvitium	do.	1500	750	140,2	13,5	27,0	Bewegung		
	do.	1500	750	79,3	7,6	15,2	Bettruhe	15,2	27,0

[1]) Der Urin der einzelnen Tagesportionen wurde entsprechend den Perioden der Ruhe einerseits, denen der Bewegung andererseits gesammelt, in dem aliquoten Teil der Gesamtharnmenge die Ameisensäure bestimmt.

Die Resultate, in der Tabelle VII zusammengestellt, beweisen, daß die Dyspnoe, wie sie durch geringe Bewegung hervorgerufen werden konnte, genügte, um die Ameisensäureausscheidung auf das Zwei- bis Dreifache des Normalen zu steigern. Daß hierbei die Dyspnoe allein eine wesentliche Rolle spielt, beweist die Tatsache, daß es bei Gesunden nach viel intensiverer Arbeit nicht gelang, die Ameisensäureausfuhr zu beeinflussen.

Um die Annahme der gesteigerten Ameisensäureausscheidung bei Dyspnoe definitiv zu beweisen, wurde im Tierexperiment versucht, durch äußerst intensive Muskelbewegung eine den eben genannten Zuständen analoge Arbeitsdyspnoe zu erzeugen; auch da gelang es, die Formiatausscheidung zu steigern. Die Versuchsanordnung war sehr einfach:

Der Hund Nr. 1 wurde durch kleine Strychningaben stundenlang in Muskelkrämpfe versetzt. Der Hund Nr. 2 lief an einem Tage mehrere Stunden in einer Tretbahn[1]. Detailliert ist der Versuch sowie die erhaltenen Resultate aus des Tabelle VIII zu ersehen.

Tabelle VIII.

Gewicht des Tieres	Urinmenge		Kalomel	Ameisensäure		Bemerkungen
	in 24 Std.	verarbeitet	mg	aus Kalomel berechnet mg	auf 24 Std. berechnet mg	
Schwarzer Spitz, 10 kg	500	500	480,0	45,8	—	Gemischte Kost. Vorperiode, Ruhe.
	880	500	802,5	76,6	120,2	4 1/2 Stunden Strychninkrämpfe.
	500	500	157,8	15,1		Sehr matt, Ruhe.
Weißer Spitz, 6 kg	500	500	135,2	12,0	—	1. Tag. Vorperiode. Ruhe.
	250	250	52,7	5,0	—	2. „ Gemischte Kost.
	250	250	70,0	6,6	—	3. „
	500	500	75,7	7,2	—	4. „
	900	450	161,2	30,8	—	Versuch. 3 1/2 Stunden Tretbahnlaufen.
	450	450	544,0	51,9	—	1. Tag. Nachperiode.
	300	300	340,0	32,4	—	2. „
	200	200	45,0	4,3	—	3. „
	320	320	48,2	4,6	—	4. „

[1]) Der Hund Nr. 1 wurde durch Injektionen von 0,2 bis 0,6 mg Strychnin in 1/4 stündigen Intervallen von 6 bis 8 Uhr abends und von 9 Uhr 30 Min. bis 11 Uhr vormittags des nächsten Tages in fort-

Es ist also gelungen, durch übermäßige Muskelarbeit und die dadurch bedingte Dyspnoe die Ameisensäureausscheidung auf das Drei- bis Fünffache zu steigern.

Auf eine lokale Asphyxie ist vielleicht die gesteigerte Ameisensäureausfuhr in einem Falle von Marschhämoglobinurie zurückzuführen, der zu Angiospasmen neigte und bei dem wir Gefäßkrämpfe als Ursache des hämoglobinurischen Anfalles angenommen haben[1]).

Tabelle IX.

Name und Krankheit	Urinmenge in 24 Std.	Urinmenge verarbeitet	Kalomel mg	Ameisensäure aus Kalomel berechnet mg	Ameisensäure in 24 Std. mg	Bemerkungen
C., Marsch-Hämoglobinurie[2])	1400	700	417,4	39,9	79,8	Anfall, Dauer 3 Std.
	800	450	79,0	7,6	15,2	1 Tag vor dem Anfall.
	1100	550	125,4	12,0	24,0	Anfall, Dauer 2 1/2 Std.
	1500	500	66,0	6,3	18,9	Anfall.
	900	450	103,0	9,8	19,6	1 Tag nach dem Anfall.
	1100	550	76,7	7,3	14,6	2 Tage nach dem Anfall.

Vom Normalwert 15,2 mg steigt also die Ameisensäure an den Anfallstagen und dem folgenden Tage auf 24 bis 79,8 mg. Es sei hier erwähnt, daß Cromer und Seligmann nach Zufuhr von ameisensauren Salzen Methämoglobinbildung beobachteten, daß weiter Döpner angibt, Ameisensäure wirke hämolytisch, in vitro Methämoglobin bildend.

Bei dieser Gelegenheit soll auf eine Eigentümlichkeit der Formiatausscheidung die Aufmerksamkeit gelenkt werden: auf ihre protrahierte Elimination. Einigen Autoren, die sich mit quantitativen Ameisensäurebestimmungen beschäftigten, fiel es

während den Krämpfen erhalten, die zeitweise so intensiv waren, daß zweimal wegen Asphyxie künstliche Atmung vorgenommenn werden mußte.

Der Hund Nr. 2 ist am Versuchstage vormittags 2 Stunden, nachmittags 1 1/2 Stunden in der Tretmühle so schnell gelaufen, daß er nach dem Versuch vollkommen erschöpft war.

[1]) Porges und Strisower, Wiener klin. Wochenschr. 1912, Nr. 4.

[2]) Die blutigen Harnportionen wurden gesondert aufgefangen, mit Ammoniumsulfat gefällt, das Filtrat mit dem restlichen Urin destilliert und wie gewöhnlich verarbeitet. Um das Schäumen des Urins infolge von hohem Eiweißgehalt zu vermeiden, wurde der Harn der Nephritiker und Vitien öfters mit Tannin versetzt, ev. die Destillation öfters unterbrochen.

auf, daß die Ausscheidungskurve erst am 2. bis 3. Tage die Höhe erreicht, um am 3. bis 4. Tage abzuklingen. So betont Pohl, daß die aus Methylalkohol im tierischen Körper entstandene Ameisensäure erst am 3. bis 4. Tage nach der Vergiftung ihr Maximum erreicht. Auch Haas[1]) findet bei seinen Glyoxylsäurefütterungsversuchen erst am 2. bis 3. Tage den Anstieg der Ameisensäureausscheidung. Bei meinem Versuch (Tabelle VIII, Hund II) sowie in der letzten Tabelle (IX) erreicht die Ameisensäureausscheidung erst am 2. Tage den höchsten Wert und fällt dann langsam ab. Ich führe diese Tatsache an, weil sie imstande ist, einen scheinbaren Widerspruch zu erklären. Viele dekompensierte Patienten, besonders mit Nephritis, zeigen eine geringe Ameisensäureausscheidung. Erst wenn das Herz besser arbeitet und die Diurese steigt, steigt auch die Formiatmenge im Urin. Daß es sich dabei nicht einfach um eine Ausschwemmung der retinierten Fettsäure handelt, zeigen einige in den früheren Tabellen wiedergegebene Serienversuche. Die Steigerung der Formiatausscheidung hält mehrere Tage an.

Wie erwähnt, gehen noch andere Erkrankungen mit einer erhöhten Formiatelimination einher. An erster Stelle sei der Diabetes erwähnt.

Schon C. Le Noble und Jaksch haben in Einzelfällen hohe Fettsäuremengen gefunden, jedoch keine quantitativen Angaben gemacht. Auch Dakin hat, wie erwähnt, auf Vermehrung der Ameisensäure bei Zuckerharnruhr hingewiesen. Tabelle X stellt eigene diesbezügliche Erfahrungen zusammen.

Es sei im Anschlusse an die Tabelle X erwähnt, daß in 500 ccm Blut[2]) (im Coma diabeticum einer Patientin entnommen) 45 mg Ameisensäure gefunden worden sind, während bei 2 Patienten (Hämoglobinurie 100 ccm und Urämie 300 ccm Blut) bloß einige Milligramm vorhanden waren.

---

[1]) Haas, Schicksal der Glyoxylsäure im Tierkörper. Diese Zeitschr. **46**, 227, 1912.

[2]) Die Ameisensäurebestimmung im Blut wurde folgendermaßen ausgeführt: Zu 2500 ccm siedender Mononatriumphosphatlösung wurden 500 ccm Blut tropfenweise zugefügt, das ausgefällte Eiweiß abfiltriert, ein aliquoter Teil des Filtrats destilliert, das Destillat wie gewöhnlich behandelt. Die Kalomelmenge wurde auf das ursprüngliche Volumen Flüssigkeit umgerechnet.

Tabelle X.

Nr.	Name und Krankheit	Urinmenge in 24 Std.	Urinmenge verarbeit.	Kalomel mg	Ameisensäure aus Kalomel berechn. mg	Ameisensäure in 24 Std. mg	Kostform	Harnbefund
1	K., Diabetes	1800	500	422,0	40,3	145,1	Gemüsetag	Zucker 20 g, Aceton ++, Acetessig +.
2	M., do.	1200	500	52,5	5,1	12,2	Strenge Diät, 75 g Kohlenhydrate	Zucker 10 g, Aceton 0.
3	K., do.	1100	500	435,8	41,3	90,9	Strenge Diät	Zucker 3,3 g, Aceton +, Acetessig 0.
4	B., do.	2100	700	65,4	6,2	18,6	Gemüsetag, 1/4 l Obers	Zucker 30 g, Aceton +, Acetessig 0.
5	W., do.	5300	700	378,0	36,1	229,0	Strenge Diät	Zucker 125 g, β-Oxybuttersäure 35 g, Aceton ++.
6	K., do.	1200	600	66,0	6,3	9,5	do.	Zucker 4,4 g, Aceton 0.
7	E., do.	1500	500	450,0	43,0	129,0	Gemüsetag	Zucker 0, Aceton 1,25 g, β-Oxybuttersäure 13,4 g.
8	E., do.	1400	400	29,0	2,8	9,8	Strenge Diät	Zucker 4,2 g, Aceton +.
9	E., do.	1500	500	48,4	4,6	13,2	do.	Zucker 3 g, Aceton 3,78 g.
10	E., do.	2000	500	393,1	56,7	226,8	250 g Hafer, 250 g Fett	Zucker in Spuren, Aceton ++, Acetessig +.
11	E., do.	900	450	57,8	5,5	11,0	Gemüsetag	Zucker in Spuren, Aceton +, Acetessig +.
12	E., do.	800	400	508,1	48,6	97,2	Strenge Diät	Zucker 0, Aceton 1,02 g, Acetessig +.
13	H., Nierendiabetes	1400	800	wenig	—	—	Strenge Diät, 1/8 l Obers, 1/2 Litonbrot	Zucker 19,2 g, Aceton in Spuren.
14	H., do.	1000	500	30,1	2,9	5,8	Gemischte Diät	Zucker 6 g, Aceton in Spuren.

Aus der Tabelle IX ist ersichtlich, daß bei Diabetes mellitus die Ameisensäureausscheidung fast immer (der Fall 13, 14 ist als Schwangerschaftsglucosurie gesondert zu betrachten) gesteigert ist, besonders hochgradig bei Acidose. Jaksch hat die Entstehung dieser Fettsäure aus dem im Harn präformierten Aceton erwogen. Dies kann nach eigenen Kontrolluntersuchungen ausgeschlossen werden; weder bei Anwesenheit von Oxybuttersäure noch Krotonsäure oder Aceton wurde Ameisensäure im Destillat gefunden. Daß der Zucker bei den chemischen Operationen keine Ameisensäure abspaltet, wurde oben betont. Diese Fehlerquelle wurde sowohl durch Kontrollen als auch durch die Beobachtung ausgeschlossen, daß bei fehlendem Zucker und bestehender Acidose im diabetischen Harn viel Ameisensäure zu finden ist. Endlich sei nochmals erwähnt, daß durch Kon-

servierung des Urins durch Borsäure die bakterielle Zuckergärung, bei der bekanntlich meistens Ameisensäure gebildet wird, hintangehalten worden ist.

Es scheint also die Annahme berechtigt, daß die Bildung der Ameisensäure parallel der der Acetonkörper einhergehe. Die höchsten Ameisensäurewerte weisen doch die Fälle mit hochgradiger Acidose auf (Fall 1, 3, 5, 7, 10, 12), andererseits wurden normale, ja sogar subnormale Werte bei fehlender Acidose und mäßiger Zuckerausscheidung gefunden (Fall 2 und 6). Die Erklärung dieser Tatsache soll im nächsten Abschnitt im Zusammenhange gegeben werden.

Eine andere Krankheit, die konstant mit einer mäßig erhöhten Formiatausscheidung einherzugehen scheint, ist die Leukämie. Schon Jaksch konnte eine Vermehrung der flüchtigen Fettsäuren bei 4 von 6 untersuchten Leukämien konstatieren; Scherer und Jakubasch fanden dann in je einem Falle eine vermehrte Ameisensäureausscheidung.

In 5 Fällen, die wir zu untersuchen Gelegenheit hatten, wurden konstant hohe Werte beobachtet, die zwischen 21,9 und 64,8 mg schwankten, wie aus folgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle XI.

Name und Krankheit	Urinmenge in 24 Std.	Urinmenge verarbeitet	Kalomel mg	Ameisensäure aus Kalomel berechnet mg	Ameisensäure in 24 Std. mg	Bemerkungen
W., Leukämie	700	700	229,4	21,9	21,9	Gemischte Diät, Bettruhe.
M., do.	500	1100	183,7	17,5	38,9	Thoriumbehandlung, Ödeme.
U., do.	1200	500	125,2	11,9	27,8	do.
W., do.	1400	700	336,8	32,1	64,2	do.
S., do.	1000	500	65,8	5,4	10,8	Gemischte Diät, nach Benzoltherapie 20000 Leukocyten.
S., do.	1300	650	37,0	6,3	12,6	
S., Acute Leukämie	1200	600	157,2	15,0	30,0	Starke Dyspnoe.

Worauf die in diesen Fällen konstatierte Ameisensäurevermehrung zurückzuführen ist, ist schwer zu entscheiden. Es liegt nahe, sie mit der vermehrten Zerstörung der weißen Blutkörperchen in Verbindung zu bringen. Dafür würde vielleicht

sprechen, daß im Falle 5 und 6, wo eine deutliche Besserung bei Benzoltherapie zu konstatieren war, die Werte normal waren. Vielleicht ist auch die bei allen Patienten beobachtete Anämie mit Kachexie teilweise an der Erhöhung der Ameisensäureausscheidung beteiligt.

Endlich soll hier noch ein Fall von Muskeldystrophie besprochen werden, der konstant hohe Ameisensäurezahlen zeigte. Es handelte sich um eine hochgradige Atrophie der Schulter-, Rücken-, Hüft- und Beinmuskulatur, so daß die Patientin sich weder aufsetzen noch gehen konnte, ständig zu Bette lag und eine hochgradige Fettsucht aufwies.

Tabelle XII.

Name und Krankheit	Urinmenge		Kalomel	Ameisensäure		Bemerkungen
	in 24 Std.	verarbeitet	mg	aus Kalomel berechnet mg	in 24 Std. mg	
K., Muskeldystrophie	1400	800	261,7	25,0	43,7	Kefirmilchdiät.
K., do.	1200	800	258,0	25,7	37,0	Fleischdiät.

Die in dieser Tabelle beobachtete hohe Ameisensäureausscheidung ist wohl als ein Ausdruck des gestörten Muskelstoffwechsels aufzufassen. Gestützt wird diese Ansicht durch die Befunde von Stepphuhn und Schellbach[1]), die nach Injektion von Formiaten die größte Menge von Ameisensäure in den Muskeln beobachtet haben (beim Kaninchen wurden kurze Zeit nach der Injektion der Ameisensäurelösung im Muskel 18,84°/₀ gegen 7,42°/₀ im Blut und 1,3°/₀ Ameisensäure in der Leber gefunden. Beim Hund im Muskel 26,7°/₀ gegen 11,76°/₀ im Blut). Es scheint demnach die Muskulatur die Fähigkeit zu haben, die Ameisensäure an sich zu reißen und zu Kohlensäure und Wasser zu verbrennen, bloß ein ganz geringer Teil wird im Urin ausgeschieden. Es liegt die Vorstellung nahe, daß bei einer so hochgradigen Erkrankung der gesamten Muskulatur die Ameisensäure in größerer Menge unverbrannt aus-

[1]) Stepphuhn und Schellbach, Ameisensäure als Zwischenprodukt der tierischen Zuckerspaltung. Zeitschr. f. phys. Chem. 80, 275, 1912.

geschieden wird. Übrigens wird noch weiter unten genauer auf die Beziehungen des Muskelstoffwechsels und Ameisensäurebildung eingegangen.

Sollte sich der Befund öfters erheben lassen, so würde er vielleicht Licht werfen auf eine Muskelstoffwechselstörung, deren Ausdruck morphologisch die Degeneration und Atrophie der Muskulatur ist.

IV. Die Muttersubstanzen der Ameisensäure und die Ursache ihrer Vermehrung in einzelnen pathologischen Zuständen.

Wir haben in den vorhergehenden Abschnitten die Ameisensäure als gewöhnlichen Bestandteil des Harns kennen gelernt, viele Krankheiten mit normalen, einige mit erhöhter Formiatausscheidung angeführt. Es erübrigt noch, die Frage nach den Muttersubstanzen dieser Fettsäure zu erörtern, um die Ursache ihrer Vermehrung zu verstehen bzw. den Zusammenhang mit der pathologischen Veränderung einzelner Organe und der daraus resultierenden Stoffwechselstörung aufzudecken.

Da die Ameisensäure ein tiefes Oxydationsprodukt, eine Vorstufe der Kohlensäure ist und außerhalb des Organismus durch Oxydation verschiedenster Körper entsteht, liegt die Vermutung nahe, daß sie auch im tierischen Organismus beim Abbau sowohl der Kohlenhydrate wie auch der Eiweißkörper und Fette durch Abspaltung und Oxydation der Carbonyl- und Methylgruppen gebildet wird.

Die auf diese Frage bezugnehmenden Angaben einzelner Autoren sollen hier kurz gestreift werden.

Die eingangs erwähnten Forscher (Rokitansky, Lewin, Blumenthal) nahmen die Bildung der Ameisensäure aus Kohlenhydraten an; ihnen schließt sich auf Grund von Tierexperimenten Stepphuhn und Schellbach an, die beim Hunde bei Zugabe von 30 g Glucose zur Fleischnahrung eine Vermehrung der Formiate von 5 mg auf 11,8 bis 17,7 mg fanden. Auch Lusk[1]) und Stoklasa[2]) glauben, daß im tierischen Organismus, ähnlich wie es bei der Hefegärung Schade

[1]) Lusk, Ernährung und Stoffwechsel. Verlag von Bergmann. Wiesbaden 1910.

[2]) Stoklasa, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 36, 4058.

und Stepphuhn fanden, das Zuckermolekül über verschiedene Zwischenstufen in ein Aldehyd und Ameisensäure zerfalle.

Als die unmittelbaren Vorstufen der Ameisensäure im tierischen Organismus erkannte Dakin[1]) auf Grund seiner Versuche die Essig-Propion-Butter-Valeriansäure, Haas[2]) auf Grund von Leberdurchblutungen die Glyoxylsäure. (Bei Durchblutung von 95 g Leber fand er 33,5 bis 62,7 mg Ameisensäure mehr als in den Kontrollen. Auch beim Versetzen des Leberbreies mit 0,8 g Glyoxylsäure wurden 22,8 mg Ameisensäure gebildet. Ein Hund schied nach Verfütterung von 4,7 g Glyoxylsäure um 23,5 bis 54,1 mg Ameisensäure mehr aus, als während der Kontrolltage.) Aus allen angeführten Angaben geht hervor, daß die meisten Autoren die Ameisensäure als ein Abbauprodukt der Kohlenhydrate über niedere Fettsäuren (hauptsächlich Milchsäure) betrachten.

Eine einfache Überlegung weist jedoch darauf hin, daß sie auch aus Fett entstehe, da die Fette durch fortgesetzte Spaltung niedere Fettsäuren — vorwiegend Essigsäure — liefern. Auch die Tatsache, daß man bei diabetischer Acidosis sehr hohe Formiatausscheidung findet, spricht für ihre Entstehung aus Fetten und Eiweißkörpern analog der Acetonkörper.

Bei der nahen Beziehung der Derivate der Eiweißkörper, der Aminosäuren zu den Fettsäuren und der Leichtigkeit, mit der sie im Tierkörper ineinander übergehen, ich nenne bloß die Bildung von Brenztraubensäure und Milchsäure aus Alanin, der Essigsäure aus Glykokoll, ist wohl anzunehmen, daß auch aus Eiweiß, wenn auch im beschränkten Maße, Ameisensäure gebildet werden mag.

Es wäre demnach die Ameisensäure als ein gemeinsames intermediäres Abbauprodukt der Kohlenhydrate, Fette und Eiweißkörper anzusehen.

Diese theoretische Überlegung wird durch eigene Versuche gestützt, und zwar:

1. Durch die in der Tabelle IV zitierten Versuche der Beeinflussung der Ameisensäure durch verschiedene Kostformen.

---

[1]) Dakin and Wakeman, Formic acid as an intermediary substance in the catabolism of fatty acids and other substances. Journ. of Biol. Chemistry 1911, Nr. 9, S. 327.

[2]) Haas, l. c.

2. Die in der Tabelle X augeführten Serienversuche an Diabetikern, sowohl bei strenger, als auch gemischter Kost.

3. Das Vorkommen der Ameisensäure bei hungernden Tieren (ein 4 Tage hungernder Hund, Gewicht 3500 g, schied in 200 ccm wenig Ameisensäure aus, Kalomel nicht gewogen. Am 6. Hungertage wurden in 180 ccm Urin 4,1 mg Ameisensäure, entsprechend 43,3 mg Kalomel, gefunden).

Es erscheint somit die Annahme berechtigt, daß die Ameisensäure als ein intermediäres Stoffwechselprodukt aller Nährstoffe auftritt; es bleibt noch zu diskutieren, worauf ihre pathologische Vermehrung zurückzuführen ist. Wie aus dem III. Abschnitt zu ersehen ist, sind hier zwei krankhafte Zustände gesondert zu betrachten: 1. die Asphyxie, 2. die diabetische Acidose.

Ad 1. Die Steigerung der Formiatausscheidung wurde gefunden: 1. bei dekompensierten Vitien trotz absoluter Bettruhe, 2. bei kompensierten Vitien nach Muskelbewegung, 3. bei arbeitsdyspnoischen Hunden. Allen diesen Zuständen gemeinsam ist die Asphyxie, der Sauerstoffmangel. Bei Sauerstoffmangel ist das Auftreten von sauren Substanzen vielfach erwiesen worden, so bei Kohlenoxydvergiftung, bei kardialer Dyspnoe (herabgesetzte Kohlensäurespannung nach Porges, Leimdörfer, Markovici[1]), ferner bei lokaler Asphyxie infolge von Muskelkrämpfen und dgl. Man hat hier insbesondere die Bildung von Milchsäure vermutet, dieselbe jedoch selten nachgewiesen. Da die Milchsäure sich mit Leichtigkeit in Acetaldehyd und Ameisensäure spaltet, so wird man nicht fehlgehen, für die Vermehrung der Ameisensäure den Sauerstoffmangel verantwortlich zu machen.

Dabei muß es unentschieden bleiben, ob der Anstieg der Formiatausscheidung auf einer pathologischen Spaltung der vermehrten Milchsäure oder auf der herabgesetzten Verbrennungsfähigkeit der in normalen Mengen gebildeten Ameisensäure durch die asphyktischen Muskeln beruhe.

Ad 2. Eindeutig ist die Erklärung der Ameisensäurevermehrung bei Diabetes. Es wurde oben bemerkt, daß

[1]) Porges, Leimdörfer, Markovici, Über Kohlensäurespannung in der kardialen und pulmonalen Dyspnoe. Zeitschr. f. klin. Med. 77, 447, 1913.

sie parallel der Acidose einhergehe. Diese Beobachtung berechtigt zur Annahme, daß die Ameisensäure analog den Acetonkörpern auf eine vermehrte Verbrennung der Fette zurückzuführen ist. Die Fette enthalten hohe Fettsäuren, die durch sukzessive Abspaltung in niedere Fettsäuren übergehen, von denen viele nach den zitierten Versuchen von Dakin als Muttersubstanzen der Ameisensäure zu betrachten sind. Ob bei Diabetes auch ein herabgesetztes Verbrennungsvermögen für Fettsäuren, wie sie Stadelmann für Milchsäure nachwies, eine Rolle spielt, muß dahingestellt bleiben.

Kurz zusammenfassend sollen die Ergebnisse dieser Arbeit wiedergegeben werden:

1. Es wird eine Methode zur Bestimmung der Ameisensäure im Urin angegeben, die über 90% Ausbeute gibt.

2. Die Ameisensäure ist ein normales intermediäres Stoffwechselprodukt und findet sich physiologischerweise in der Menge von durchschnittlich 13,5 mg im Tagesurin.

3. Ihre Menge wird weder durch einseitige Ernährung noch durch mäßige Muskelbewegung beeinflußt.

4. Bei vielen Krankheiten, wie kompensierten Herzaffektionen, Carcinom, Ulcus ventriculi, Polyglobulie, Cholelithiasis, Obstipation, bei fieberhaften Erkrankungen wie Typhus, Tuberkulose, Pneumonie, Angina tonsillaris usw. findet man normale Ameisensäuremengen.

4. Vermehrt erscheint sie bei asphyktischen Zuständen: dekompensierten Herzzuständen, bei Arbeitsasphyxie der Herzkranken und Tiere.

5. Auch bei Diabetes steigt die Ameisensäureausfuhr als Zeichen eines qualitativ und quantitativ veränderten Fettstoffwechsels.

6. Bei einem Fall von Muskeldystrophie zeigte die Ameisensäure eine mäßige Vermehrung, vielleicht als Ausdruck des gestörten Muskelchemismus.

Quantitative Bestimmungen der Cholesterinstoffe neben einander.

Zweiter Teil[1]): Cholesterin.

Von

J. Lifschütz, Hamburg.

(Eingegangen am 7. Juli 1913.)

I.

Die Frage nach der quantitativen Ermittelung des primären neutralen „Verbrennungsproduktes" des Cholesterins in den tierischen Organen, des sogenannten Oxycholesterins, neben dem Cholesterin, ist an dieser Stelle im oben zitierten ersten Teil dieser Arbeit ausführlich erörtert worden. Das Verfahren zu diesen analytischen Ermittelungen des Oxycholesterins beruht auf vergleichenden spektrometrischen Messungen der Absorptionsspektra der Farbreaktionen, die man mit Eisessig-Schwefelsäure in den Chloroformlösungen einerseits der auf Oxycholesterin zu untersuchenden Substanz und andererseits in einer Testlösung mit bekanntem Oxycholesteringehalt gleichzeitig hervorruft. Unter Voraussetzung der Richtigkeit des Satzes von der Proportionalität der Spektralintensitäten in den farbigen Lösungen zu dem jeweiligen Oxycholesteringehalt derselben, stößt man bei dieser Substanz insofern auf keine erheblichen Schwierigkeiten, als die in Rede stehende Farbreaktion mit Eisessig-Schwefelsäure, auf der sich ja das Verfahren aufbaut, nur dem Oxycholesterin allein zukommt, an der also das stets dabei anwesende Cholesterin sich gar nicht beteiligt.

[1]) Der erste Teil („Oxycholesterin") erschien in dieser Zeitschr. 48, 373 bis 409, 1913 unter der Überschrift „Quantitative Bestimmungen der Oxydationsprodukte des Cholesterins".

Völlig analog läßt sich, wie ich wiederholt dargetan habe, in Abwesenheit von Oxycholesterin[1]) auch das Cholesterin spektrometrisch durch das Absorptionsspektrum der Liebermannschen Cholestolreaktion mit Acetanhydrid und Schwefelsäure bestimmen. Ist aber Oxycholesterin zugegen, so ist dieses Verfahren nicht ohne weiteres anwendbar, da das Oxycholesterin, auch wenn es völlig cholesterinfrei ist, auf Acetanhydrid und Schwefelsäure ebenso reagiert, wie das Cholesterin selber.

Es ist einleuchtend, daß die bereits gegebene Möglichkeit einer quantitativen Bestimmung des Oxycholesterins nur dann ihren vollen Wert erlangt, wenn gleichzeitig ein einwandfreies Verfahren vorliegen würde, das gestattet, das Verhältnis dieses Cholesterinderivats zu seiner Muttersubstanz (dem Cholesterin) gleichfalls quantitativ zu ermitteln. Zur Lösung dieser Aufgabe lagen naturgemäß

die bereits vorgeschlagenen analytischen Verfahren

zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins am nächsten. Als das für diesen Zweck geeignetste Verfahren erschien die von A. Windaus[2]) empfohlene Fällung des Cholesterins aus einer 2%igen alkoholischen Lösung mittels einer 1%igen Lösung von Digitonin in 90%igem Alkohol. Dieses Verfahren empfahl sich um so mehr, als es die Möglichkeit bietet, das freie Cholesterin von den Cholesterinestern, die mit Digitonin keine in Weingeist unlösliche Verbindung eingehen, zu trennen. Vorauszusetzen war freilich, daß die neutralen Begleitstoffe des Cholesterins, die ja in den tierischen Organen und Geweben in fast gleichen Mengen wie das Cholesterin aufzutreten pflegen, mit dem überschüssigen Digitonin keine in Weingeist unlösliche oder schwer lösliche Verbindungen eingehen, die dann etwa mit dem unlöslichen Digitonincholesterid mit ausfallen könnten.

Um das Verfahren darauf zu prüfen, waren von vornherein zwei Wege gegeben. Erstens: die Prüfung des Digitoninniederschlags selbst auf die An- resp. Abwesenheit der neutralen

[1]) Vgl. auch Schlußsätze zum ersten Teil dieser Arbeit, diese Zeitschr. 48, 407.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 110, 1910. (Zit. Pharmaz. Zentralhalle 1910, Nr. 33, S. 752.)

Begleitstoffe des Cholesterins; sodann, falls diese Prüfung an der noch wenig bekannten Natur der meisten Begleitstoffe des Cholesterins scheitern sollte, — das aus den unverseifbaren Neutralstoffen der Fette der tierischen Organe und Gewebe gefällte Cholesterin, das sich aus seiner Digitoninverbindung quantitativ leicht isolieren läßt, auf seine quantitative Reinheit zu untersuchen. Übrigens existieren auch neutrale Begleitstoffe des Cholesterins, die sich durch ihre bereits bekannten scharfen Merkmale selbst in sehr geringen Mengen und in komplizierten Gemischen mit Sicherheit nachweisen lassen. Es sind dies namentlich das Isocholesterin und das sogenannte Oxycholesterin, deren ausgezeichnete Farb- und Spektralreaktionen — wenigstens in den Fällen, wo diese Stoffe zugegen sind — sehr wohl geeignet erscheinen, als Hilfsmittel bei der Prüfung des genannten Digitoninverfahrens auf seine Verwendbarkeit in diesen Fällen zu dienen.

Die interessante, wenn auch nur äußerliche Ähnlichkeit der Digitonin-Cholesteridreaktion mit der Liebermannschen Cholestolreaktion, indem diese beiden Reaktionen auf freies Cholesterin positiv zu wirken und bei dessen höheren Fettsäure-Estern negativ auszufallen pflegen[1]), ließ von vornherein vermuten, daß sich diese Ähnlichkeit auch auf die übrigen Cholesterinstoffe bzw. deren Ester erstrecken müßte, d. h. daß Digitonin auch mit freiem Oxycholesterin (und mit Isocholesterin) alkoholunlösliche oder schwer lösliche Verbindungen geben müßte. Da nun das Oxycholesterin seinerseits mit dem Cholesterin in auffallendem Grade auch die Eigentümlichkeit teilt, wonach es die Cholestolreaktion mit Acetanhydrid und Schwefelsäure (und auch die Essigschwefelsäurereaktion) nur im freien Zustande gibt, nicht aber, wenn es als Ester an höhere Fettsäuren gebunden ist[2]), so war es auch sehr wahrscheinlich, daß es sich hinsichtlich seiner Fällbarkeit mit Digi-

[1]) Daß nur auf das freie Cholesterin die Liebermannsche Cholestolreaktion anwendbar ist, nicht aber auf dessen Ester, vgl. man Monatsh. f. prakt. Dermatol. **45**, 401 ff., sowie diese Zeitschr. **20**, 483 u. 484, 1909 und a. a. O. (vgl. auch weiter unten V, S. 233).

[2]) Siehe Zeitschr. f. physiol. Chem. **53**, 142, 1907; **58**, 176, 1908; Monatsh. f. prakt. Dermatol. **45**, 238, 1907 und a. a. O. (Darmstädters Wollfettwachs).

tonin gleichfalls analog dem Cholesterin verhalten müßte. In diesem Falle käme man freilich mit der Anwendung des Digitoninverfahrens zur quantitativen Bestimmung des Cholesterins bei Anwesenheit von Oxycholesterin auch nicht weiter, als mit dem spektrometrischen Verfahren.

Diese naheliegenden Erwägungen führten zu einer Reihe von Versuchen mit künstlichen sowie mit natürlichen Mischungen von Cholesterin und Oxycholesterin resp. mit Isocholesterin, sowie mit diesen reinen Cholesterinstoffen für sich, wobei jene Vermutungen ihre Bestätigung gefunden haben. Es ergab sich dabei folgendes:

1. Reines Cholesterin fällt mit Digitonin fast quantitativ als Digitonincholesterid aus.

2. Cholesterinfreies Oxycholesterin fällt aus seinen Lösungen — nach Vorschrift verfahren — mit Digitoninlösung, ähnlich wie Cholesterin, in kleinen, unter dem Mikroskop recht einheitlich aussehenden Krystallen, die zu einer weißen, silberglänzenden Masse eintrocknen und sich gegen 218° C ohne zu schmelzen zersetzen[1]). Bei 110° getrocknet ergab der Niederschlag — auf Cholesterin berechnet — 50 bis 53°/₀ des angewendeten Oxycholesterins. Der Niederschlag ist selbst in der Siedehitze sehr schwer löslich in allen indifferenten Lösungsmitteln, in denen das Oxycholesterin auch in der Kälte leicht löslich ist. Beim Kochen einer entsprechenden Menge mit 2 bis 3 ccm Eisessig löst er sich auf und gibt beim Erkalten — ohne sich wieder auszuscheiden — auf Zusatz von 8 bis 10 Tropfen Schwefelsäure eine sehr starke Oxycholesterinreaktion mit allen ihren charakteristischen Farben- und Spektralerscheinungen.

3. Ein künstlich hergestelltes Gemisch von $^1/_3$ cholesterinfreien Oxycholesterins mit $^2/_3$ reinen Cholesterins lieferte durch die Fällung mit Digitoninlösung einen Niederschlag, der nach sorgfältigem Waschen und Trocknen bei 110° C 83 bis 84 $^0/_0$ der angewendeten Menge des Gemisches ergab (auf Cholesterin berechnet) und in Eisessiglösung mit Schwefelsäure stark auf Oxycholesterin reagierte. Also, anstatt 66,6 $^0/_0$ des im Gemische enthaltenen reinen Cholesterins resultierten 84 $^0/_0$ eines

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 52, 207, 1913.

Gemenges von Digitonin-Cholesterid und Digitonin-Oxycholesterid[1]).

4. Der unverseifbare Anteil eines Blutfettes, der nur wenige Prozente Oxycholesterin enthielt, in alkoholischer Lösung mit Digitoninlösung gefällt, ergab ein Digitonin-Cholesterid, das mit Essigschwefelsäure wesentlich intensiver auf Oxycholesterin reagierte als die verarbeitete ursprüngliche Substanz selbst. Das Auffallende bei dieser Analyse war der Umstand, daß das Filtrat, vom Niederschlag getrennt, bis zur Trockne eingedampft, im Rückstande nur äußerst schwach auf Oxycholesterin (mit Essigschwefelsäure) reagierte. Es scheint also bei dieser Analyse fast der gesamte relativ kleine Oxycholesteringehalt der Substanz mit dem Cholesterin ausgefallen zu sein.

5. Eine alkoholische Lösung von reinem Isocholesterin, in vorgeschriebener Weise mit Digitoninlösung versetzt, scheidet langsam einen leichtflockigen Niederschlag ab, der 42 bis 49% vom angewandten Isocholesterin (auf Cholesterin berechnet) ergibt. Auch dieser Niederschlag löst sich — im Gegensatz zum Isocholesterin — nur sehr schwer in kochenden indifferenten Lösungsmitteln. In wenig kochendem Eisessig gelöst, mit etwa dem doppelten Volumen Acetanhydrid verdünnt und in der Kälte mit einigen Tropfen konzentrierter Schwefelsäure vermischt, zeigt er die für Isocholesterin charakteristische Reaktion in Farbe und Absorptionsspektrum[2]). Also auch das Isocholesterin geht mit Digitonin eine in Weingeist schwer lösliche Doppelverbindung ein.

Wie ich im ersten Teile dieser Arbeit[3]) bereits angedeutet habe, erscheint nach den obigen Feststellungen die Bestimmung des Cholesterins als Digitonin-Cholesterid unter den bisher vorgeschriebenen Bedingungen neben Oxycholesterin, was ja in den tierischen Lipoiden und Fettgebilden sehr häufig der Fall ist, nicht bedingungslos anwendbar.

---

[1]) Nimmt man an, daß das Digitonin das gesamte Cholesterin ausgefällt hat, so mußte hier mindestens die Hälfte des im Gemisch zur Anwendung gelangten Oxycholesterins, also über 15% des Gemisches, aus der Lösung mit ausgefallen sein.

[2]) Vgl. Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 31, 100 und a. a. O.

[3]) Diese Zeitschr. 48, 374, 1913 und daselbst 52, 207, 1913.

Die Bestimmung der Cholesterinstoffe durch colorimetrische Messungen der Liebermannschen Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion (Cholestolreaktion) ist bereits vor vielen Jahren, wenn ich nicht irre, von E. Schulze, dem Entdecker des Isocholesterins, vorgeschlagen worden. In neuerer Zeit haben sich einige Autoren wieder diesem Verfahren zugewandt[1]).

Aber auch dieses Verfahren ist aus mannigfachen Gründen für den hier verfolgten Zweck nicht ohne weiteres anwendbar. Zunächst ließe sich hier im besten Falle das Cholesterin für sich neben Oxycholesterin, worauf es ja im Blute und auch in manchen Organen ankommt, gar nicht bestimmen, weil Oxycholesterin, wie die letztzitierten Autoren selbst richtig bemerken, gleichfalls die Liebermannsche Cholestolreaktion gibt. Man könnte also z. B. im Blute höchstens die Summe von Cholesterin und Oxycholesterin colorimetrisch bestimmen. Aber auch in diesem Sinne wären die erlangten Werte nicht bedingungslos einwandfrei. Bekanntlich gibt es auch eine Reihe anderer Körper, die mit Acetanhydrid-Schwefelsäure grüne Färbungen geben (Harzarten, Harzöle und dgl.). Aber auch im Unverseifbaren der tierischen Fett- und Wachsgebilde gibt es noch unbekannte Begleitstoffe des Cholesterins, die mit Essigschwefelsäure[2]) wie mit Acetanhydrid-Schwefelsäure grüne Färbungen geben, aber weder die Absorptionsspektra des Oxycholesterins noch die des Cholesterins zeigen. Es sind also möglicherweise gar keine Cholesterinstoffe, müssen aber bei colorimetrischen Messungen als solche mit in Rechnung gezogen werden. Außerdem erscheint die Reaktionsfarbe in den tierischen Fettsubstanzen nur sehr selten rein grün; häufiger aber — namentlich in Gegenwart von Oxycholesterin — ist sie gelb- bis bräunlichgrün und so mit den Testlösungen nicht übereinstimmend.

Unter den dargelegten Umständen blieb also nichts anderes übrig, als mich dem eingehenderen Studium des spektrometri-

---

[1]) Siehe A. Grigau: Neue Methode zur Cholesterinbestimmung usw. Compt. rend. Soc. Biol. **73**, 513, 1911 und W. Autenrieth und Albert Funk: Die colorimetrische Bestimmung des Gesamtcholesterins im Blute und in Organen. Münch. med. Wochenschr. **23**, 1243, 1913.

[2]) Vgl. diese Zeitschr. **48**, 376, 1913.

schen Verfahrens zuzuwenden, um die Möglichkeit herbeizuführen, das Cholesterin, und wäre es auch nur annähernd genau, neben seinen obengenannten Begleitstoffen auch quantitativ zu bestimmen.

Die Ergebnisse dieser Studien seien im folgenden wiedergegeben:

II.

Die Verwendbarkeit der Cholestolreaktion und der Essigschwefelsäurereaktion

für quantitative spektrometrische Ermittelungen, einerseits der eigentlichen Cholesterinstoffe und andererseits des Oxycholesterins nebeneinander ist nach langjährigen Erfahrungen aufgebaut auf der Gesetzmäßigkeit zweier Grundformen dieser Reaktionen, die in folgenden Sätzen ihren Ausdruck finden mögen:

1. Die Spektralintensitäten der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion auf Cholesterinstoffe und der Essigschwefelsäurereaktion auf Oxycholesterin sind direkt proportional dem Gehalt des jeweiligen Reaktionsgemisches an diesen Stoffen.

2. Die Spektralerscheinungen der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion derjenigen Cholesterinstoffe, die diese Reaktion in Farbe und Spektrum geben (Cholestol, Cholesterin, Oxycholesterin) sind in ihren Grundformen miteinander identisch.

Aus dem ersten Satze folgt, daß auch der Cholesteringehalt eines zu untersuchenden Körpers in Abwesenheit der Cholesterinderivate, die die Cholestolreaktion noch geben, durch Messungen der Spektralintensität seiner Cholestolreaktion mit der des reinen Cholesterins sich in analoger Weise berechnen läßt, wie sie im ersten Teile dieser Arbeit[1]) für die Spektrometrie des Oxycholesterins durch seine Essigschwefelsäurereaktion angegeben wurde.

Aus dem zweiten Satz — im Zusammenhang mit dem ersten Satz — folgt, daß diese spektrometrischen Messungen der Cholestolreaktion bei einem Gemisch von Cholesterin und Oxycholesterin den Gesamtwert der Summe dieser beiden Körper ergeben müssen. Bestimmt man nun den Oxycholesterin-

[1]) Diese Zeitschr. 48, 380 und 381.

gehalt des betreffenden Gemisches für sich und zieht ihn von jener Summe ab, so ergibt die Differenz den gesuchten Cholesteringehalt des zu untersuchenden Gemisches.

Der experimentellen Begründung dieser Sätze seien folgende, die in Rede stehenden Reaktionen erläuternden Betrachtungen vorangeschickt.

1. Die Liebermannsche Cholestolreaktion[1])

des Cholesterins mit Acetanhydrid und Schwefelsäure ist in ihren optischen Erscheinungsformen: in ihren Farben wie in ihren Spektralabsorptionen, der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins außerordentlich ähnlich. Die Farbenskalen der beiden Reaktionen und die Übergänge der einzelnen Farbengattungen ineinander sind bei beiden fast dieselben: sie setzen beide mit Rot oder Violettrot ein und gehen bald durch Blau in ein schönes, sattes und tief dunkles Grün über, das viele Stunden anhält und erst nach etwa 24 bis 30 Stunden verblaßt. Demgemäß sind auch die Absorptionsspektra der beiden Reaktionen von großer Ähnlichkeit; lassen aber die sehr wesentlichen Abweichungen der jeweiligen Spektralabsorptionen in den einzelnen Reaktionsstadien voneinander schon auf den ersten Blick durch das Spektroskop erkennen.

Im ersten (roten) Stadium, das bei der Cholestolreaktion in der passenden Verdünnung der Lösung nur wenige Sekunden anhält und bei der Essigschwefelsäureaktion durch mehrere Minuten beobachtet werden kann, erscheinen in beiden Fällen zwei durchsichtige Bänder im Grün des Spektrums, die mit dem Übergang der Farbe in Blau — bei der Cholestolreaktion rasch, bei der Essigschwefelsäurereaktion der Oxycholesterins langsam — verschwinden. Gleichzeitig mit diesen

---

[1]) Unter dieser Reaktion ist diejenige zu verstehen, die in einer Acetanhydridlösung der Cholesterinstoffe mit konz. Schwefelsäure hervorgerufen wird. Dieselbe Reaktion in Acetanhydrid-Chloroformlösungen wird als Liebermann-Burchardsche Reaktion bezeichnet. Diese von Burchard| variierte Cholestolreaktion ist mit der ursprünglichen Liebermannschen Reaktion insofern nicht identisch, als letztere auf die Cholesterinester der höheren Fettsäuren nicht anwendbar ist. Auf die Gründe dieser negativen Seite der Liebermannschen Reaktion werde ich in einer späteren Mitteilung zurückkommen. (Siehe auch weiter unten V, S. 233ff.)

zwei Bändern erscheint bei der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins ein tiefdunkles Band in Gelb. Die analoge Absorption erscheint bei der Cholestolreaktion erst nach dem Verschwinden der genannten zwei Bänder aus dem Grün.

Im zweiten (blauen) Stadium, das gleichfalls bei der Cholestolreaktion nur etwa 1 bis 2 Minuten dauert, bei der Essigschwefelsäurereaktion aber stundenlang anhält, verdichten sich die Absorptionen in Gelb und verbreiten sich nach und nach derart, daß sie im Spektrum das ganze Orange, das Gelb und den größten Teil des Grüns auslöschen.

Im dritten (grünen) und letzten Reaktionsstadium, das bei der Essigschwefelsäurereaktion, wie gesagt, wesentlich später einzutreten pflegt als bei der Cholestolreaktion, ziehen sich die sehr breiten Spektralabsorptionen nach und nach zusammen und hinterlassen bei der Essigschwefelsäurereaktion ein tief dunkles Band im Gelb und bei der Cholestolreaktion eine ähnliche Absorption in Orange. Hier, mit dem weiteren Schwinden der Absorptionen, treten schwache dunkle Linien oder Streifchen in Rot des Spektrums auf, und zwar bei der Essigschwefelsäurereaktion zwischen den Frauenhoferschen Linien *C* und *d* und bei der Cholestolreaktion zwischen den Linien *B* und *C*. Allmählich verschwinden die Absorptionen auch aus dem Gelb resp. dem Orange gänzlich, das ganze Spektrum hellt sich vollständig auf bis auf die erwähnten Absorptionen *C*—*d* resp. *B*—*C*, die sich inzwischen zu tief dunklen, fast scharf begrenzten und ziemlich breiten Streifen entwickelt haben. Im wesentlichen unterscheiden sich, wie ersichtlich, die beiden komplizierten Spektralbilder dadurch, daß das der Essigschwefelsäurereaktion gegenüber dem der Cholesterinreaktion um eine beträchtliche Anzahl Wellenlängen dem Ultrarotende des Spektrums näher gerückt erscheinen.

Aus der geschilderten optischen Ähnlichkeit der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion der Cholesterinstoffe mit der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins darf selbstredend höchstens auf die nahe Verwandtschaft des letzteren mit seiner Muttersubstanz, dem Cholesterin, geschlossen werden. Daß von einer etwaigen „Identität“ dieser beiden Reaktionen nicht die Rede sein kann, folgt schon aus der totalen Verschiedenheit der Medien, in denen sie hervor-

gerufen werden, sowie aus dem Umstand, daß die Essigschwefelsäure auf Cholesterin überhaupt nicht reagiert (weder der Farbe noch dem Spektrum nach), vielmehr bleibt das Gemisch in diesem Falle, wenn es mit wirklich reinem Cholesterin und reinen Reagenzien hergestellt ist, fast völlig farblos. Eine etwaige bräunliche Färbung pflegt auch von der Essigschwefelsäure an und für sich herzurühren[1]).

2. Der Ausbau der Spektrometrie der eigentlichen Cholesterinstoffe für analytische Zwecke

erheischt zunächst die Ausgestaltung der Liebermannschen Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion (Cholestolreaktion) zu einer konstanten und in allen Fällen unfehlbar sicher zu handhabenden Erscheinung mit ausgesprochenen, den Launen des Zufalls nicht unterliegenden Merkmalen. Dies hatte zur Voraussetzung: 1. die Kenntnis der höchsten Entwicklungsstufe der Reaktionsintensität, namentlich aber des für die vergleichende Spektrometrie geeignetsten letzten Stadiums der Reaktion; 2. die Ermittlung der Möglichkeit, wonach man die Reaktion gerade auf dieses Stadium einzustellen vermag, so daß die höchste Intensität dieser letzten Entwicklungsstufe mit dem Höhepunkt der Gesamtreaktion überhaupt zeitlich möglichst zusammenfällt, und 3. die Bestimmung des Umfangs der Reaktionsempfindlichkeit überhaupt.

Die Leichtigkeit, mit der sich diese Feststellungen bei der Spektrometrie des Oxycholesterins vermittels der Essigschwefelsäurereaktion bewerkstelligen ließen, lag zunächst in der Eigentümlichkeit dieser Reaktion: bei ihrer Hervorrufung ohne wesentliche Temperaturerhöhung des Reaktionsgemisches vor sich zu gehen, sowie in ihrer relativ geringen Empfindlichkeit gegen Temperatursteigerungen überhaupt. Sehr wesentlich kam hier den Feststellungen obiger Reaktionsbedingungen der Umstand zugute, daß die höchste Entwicklungsstufe des für die Spektrometrie geeigneten letzten Stadiums der Essigschwefelsäurereaktion sich rasch, schon nach wenigen Minuten nach der Herstellung des Reaktionsgemisches, durch Zusatz einer geringen Menge Eisenchloridlösung, also durch künstliche

[1]) Mischt man Eisessig mit ca. 10% konz. Schwefelsäure, so färbt sich die Mischung schwach bräunlich (siehe weiter unten S. 223).

Oxydation, fast momentan hervorrufen läßt (was ohne diesen Kunstgriff erst nach mehreren Stunden einzutreten pflegt), während dies bei der sonst so ähnlichen Cholestolreaktion nicht der Fall ist. Man ist daher in diesem Falle gezwungen, auf die natürliche Entwicklung dieser Reaktion bis zu der gewünschten Stufe 2 bis 4 Stunden (je nach der Konzentration der Cholesterinlösung und der Zimmertemperatur) zu warten, bevor man zur Messung ihrer Spektralintensität schreiten kann.

Die lästigste Eigentümlichkeit der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion bei ihrer spektrometrischen Verwertung für Cholesterinbestimmungen ist ihre Empfindlichkeit gegen Temperatursteigerungen. Nun reagiert aber bekanntlich konzentrierte Schwefelsäure auf Acetanhydrid unter bedeutender Wärmeentwicklung, so daß die Herstellung des Reaktionsgemisches in einer Acetanhydrid-Cholesterinlösung durch Zusatz von konz. Schwefelsäure fast unvermeidlich mit einer Temperatursteigerung des Gemisches verbunden ist, die die Reaktion in unerwünschter Weise beschleunigt und auch in einem für die Spektralanalyse wesentlich ungünstigen Grade beeinflußt. Indessen ließ sich eine beträchtliche Wärmeentwicklung dadurch umgehen, daß man den Schwefelsäureaufwand auf ein äußerstes Minimum beschränkte. Die Befürchtung, die Reaktion könnte bei einer zu geringen Schwefelsäuremenge nur unvollständig vor sich gehen, stellte sich bei den betreffenden Versuchen als unbegründet heraus. Dagegen machte ich bei diesen Versuchen die interessante Beobachtung, daß man — je nach der Menge der zur Acetanhydrid-Cholesterinlösung zugesetzten Schwefelsäure — den höchsten Punkt der Reaktionsintensität (in Farbe wie im Spektrum) nach dem (zweiten) vorletzten oder auch nach dem für die Spektrometrie geeignetsten letzten (dritten) Reaktionsstadium nach Belieben verlegen kann. Und zwar fällt dieser Höhepunkt bei geringstem Schwefelsäurezusatz in das letzte Stadium (mit dem Spektrum im Rot) und bei einem Überschuß von Schwefelsäure in das vorletzte Stadium der Reaktion (mit der Absorption im Orange usw., vgl. oben S. 220). Auf diese Weise gelang es, das für die spektrometrischen Messungen weniger geeignete vorletzte (zweite) Reaktionsstadium, wenn auch nicht, wie es bei der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins durch Eisenchlorid der Fall ist,

vollkommen zu beseitigen, so doch auf ein sehr geringes Minimum zu reduzieren, und so auch dieses vorletzte Reaktionsstadium, wenigstens bis zu einem gewissen, für die analytischen Spektralmessungen belanglosen Grade auszuschalten.

Um aber bei diesen Versuchen jeder Möglichkeit einer Wärmeentwicklung selbst bei Zusatz von sehr geringen Schwefelsäuremengen zu begegnen, bediene ich mich mit Erfolg eines Gemisches von 1 Volumen konzentrierter Schwefelsäure und 10 Volumen Eisessig. Ich bezeichne diese Mischung der Kürze wegen als „Essigschwefelsäure". Sie ist von schwacher bräunlicher Farbe, aber in den für die Spektrometrie in Betracht kommenden Schichten von 15 bis 20 mm vollständig farblos. Sie ist von wesentlich geringerer Hygroskopizität als Schwefelsäure, läßt sich gut und unverändert aufbewahren und leistet als Reagenz bei der Essigschwefelsäurereaktion auf Oxycholesterin[1]), besonders aber bei der Cholestolreaktion ausgezeichnete Dienste. 0,25 ccm dieser „Essigschwefelsäure" entsprechen 1 Tropfen H_2SO_4, wie er aus der Mündung einer Reagenzflasche bei vorsichtiger Neigung derselben herauszufallen pflegt.

3. Läßt sich aber — nach dem Obengesagten — der Höhepunkt der Reaktionsentwicklung bei der Cholestolreaktion in Farbe und Spektrum willkürlich nach dem einen oder dem anderen Reaktionsstadium verlegen, so muß es auch möglich sein, den Umfang nicht nur der allgemeinen Reaktionsempfindlichkeit, sondern auch den der einzelnen Stadien der Reaktion unabhängig voneinander durch

die minimalen Spektralabsorptionen (Grenzspektra)

in ähnlicher Weise, wie dies bei der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins geschehen ist[2]) zu bestimmen.

Die Durchführung dieser Bestimmungen geschahen in folgender Weise:

[1]) 1 ccm der Chloroformlösung des Oxycholesterins braucht nur mit 2 ccm dieser „Essigschwefelsäure" (entsprechend 8 Tropfen Schwefelsäure) versetzt zu werden, um die Reaktion hervorzurufen.

[2]) Diese Zeitschr. 48, 403, 1913.

Versuch 1.

Minimalabsorption des vorletzten (zweiten) Reaktionsstadiums.

1 ccm einer 0,207 %igen Cholesterinlösung in Chloroform wurde mit 2 ccm Acetanhydrid verdünnt und unter Kühlung mit 8 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure vermischt[1]). Das Gemisch betrug 3,25 ccm mit 0,0637 % Cholesterin. Bei diesem großen Überschuß an Schwefelsäure trat die Reaktion sofort ein und erlangte nach 1 Stunde, und zwar im zweiten (vorletzten) Reaktionsstadium, ihre höchste Intensität in der tiefgrünen Farbe sowie in ihrer bereits oben geschilderten starken Spektralabsorption im Orange und Gelb des Spektrums. Im roten Spektralfeld war noch keinerlei Absorption wahrnehmbar: das dritte (letzte) Reaktionsstadium war also noch nicht eingetreten. Hier wurde dem Reaktionsgemisch 1 ccm entnommen, in einen Zylinder von 18 mm Durchmesser gebracht und mit Eisessig so lange vorsichtig verdünnt, bis die dabei nach und nach schwindende Spektralabsorption bei einer Lichtquelle von 100 HK und engster Spaltöffnung des Spektroskops im Orange eben nur noch als schwache Andeutung einer Absorption merklich sichtbar war, die bei einer weiteren geringfügigen Verdünnung der Lösung gänzlich verschwand. Es wurden dabei 5,5 ccm Eisessig verbraucht. Die noch grüne Lösung betrug im ganzen 6,5 ccm mit 0,0098 % Cholesterin. Mithin beträgt die Empfindlichkeit des zweiten (vorletzten) Reaktionsstadiums der Liebermannschen Cholestolreaktion

1:10204.

Versuch 2.

Minimalabsorption des letzten (dritten) Stadiums.

1 ccm einer 0,105 %igen Cholesterinlösung in Chloroform wurde mit 2 ccm Acetanhydrid verdünnt und mit 0,25 ccm Essigschwefelsäure von der oben angegebenen Zusammensetzung, also entsprechend 1 Tropfen Schwefelsäure, vermischt[2]). Die Reaktion setzte nur äußerst langsam ein. Von ihrem ersten (roten) Stadium mit seiner Spektralabsorption im Grün war nichts zu merken. Das Gemisch färbte sich vielmehr sehr langsam grün und zeigte von der Spektralabsorption des zweiten Reaktionsstadiums einen nur schwachen, schmalen und durchsichtigen Streifen in Orange, begleitet von einer Linie in Rot, die bereits den Anfang des dritten Stadiums anzeigte. Der erstere Streifen zerfloß allmählich in einen leichten Nebel, der sich über das Orange und das Rot verbreitete, während die Linie in Rot sich nach und nach zu dem oben geschilderten dichten und dunklen Streifen *B—C* des dritten Re-

---

[1]) Bei dieser erheblichen Menge Schwefelsäure war es nicht ratsam, mit dem Essigschwefelsäuregemisch zu operieren, um die Beobachtungen der Reaktionsentwicklung nicht in allzu verdünnten Lösungen machen zu müssen.

[2]) Gemisch = 3,25 ccm mit 0,0323 Cholesterin.

aktionsstadiums entwickelte, das nach $2^1/_2$ Stunden seine höchste Intensität erreichte. Diese dokumentiert sich auch merklich durch das gänzliche Verschwinden des nebeligen Schleiers aus dem Orange und Rot, sowie durch das völlige Aufhellen des ganzen Spektrums bis auf den genannten Streifen. Hier wurde 1 ccm des Reaktionsgemisches ebenso wie oben bei dem Versuch 1 behandelt und mit Eisessig verdünnt, wobei 2,4 ccm Eisessig verbraucht wurden, so daß die Lösung nach dem Erreichen der spektralen Minimalabsorption in der oben geschilderten Weise 3,4 ccm betrug und 0,0095 % Cholesterin enthält. Mithin beträgt die Empfindlichkeit auch des letzten (dritten) Stadiums

1 : 10 526,

also im wesentlichen nahezu dieselbe wie im vorhergehenden Versuch, trotz der großen Verschiedenheit in den zur Verwendung gelangten Schwefelsäuremengen (von 1 Tropfen bzw. 8 Tropfen) und dem weit auseinanderliegenden Cholesteringehalt der bei den beiden Versuchen zur Anwendung gelangten Lösungen.

Dieser verschiedene Cholesteringehalt der beiden Versuchslösungen sollte auch gleichzeitig als Vorversuch dienen, um beiläufig auch hierdurch die Proportionalität der Spektralintensitäten zu dem jeweiligen Cholesteringehalt der Reaktionsgemische (Satz I, oben, S. 218) darzutun. Eine Reihe weiterer paralleler Versuchspaare mit derselben Verschiedenheit im Schwefelsäurezusatz, aber mit gleichem Cholesteringehalt, bestätigte die Verschiebung der Höhepunkte der Reaktionsintensitäten der beiden letzten Reaktionsstadien durch die Schwefelsäurezusätze, sowie die Übereinstimmung der Reaktionsempfindlichkeiten der beiden Stadien. Diese Empfindlichkeiten schwankten regelmäßig zwischen **1 : 10000** und **1 : 12000**[1]), wobei das letzte Stadium (im Rot) in der Regel eine etwas höhere Empfindlichkeit aufwies.

Durch diese Versuche ist wohl der Beweis erbracht, daß die Cholestolreaktion durch Verwendung einer minimalen Menge von Schwefelsäure gegenüber der Anwendung eines größeren Überschusses an dieser, weder ihrem Wesen noch dem Umfang ihrer Empfindlichkeit nach beeinträchtigt zu werden pflegt.

Aus den Erörterungen dieses Abschnittes dürfte wohl hervorgehen, daß auch die Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion unter die oben beanspruchten Bedingungen leicht

---

[1]) Wie im ersten Teile dieser Arbeit dargetan (diese Zeitschr. **48**, 403) liegt die äußerste spektrale Minimalabsorption der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins bei 0,003 % der Lösung dieses Körpers. Die Empfindlichkeit dieser Reaktion ist also **1 : 33000**. Die seither vorgenommene weitere Reinigung des Oxycholesterins ergab sogar eine mittlere Empfindlichkeit von **1 : 35000**. Die spektrale Empfindlichkeit der Cholestolreaktion ist demnach eine wesentlich geringere und beträgt rund $^1/_3$ von der der Essigschwefelsäurereaktion.

gebracht werden kann, die sie für spektrometrische Zwecke analog der Essigschwefelsäurereaktion geeignet erscheinen lassen.

III.

1. Die Proportionalität der Spektralintensität

der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion in Cholesterinlösungen zu ihrem jeweiligen Cholesteringehalt folgt schon zum Teil, wie erwähnt, aus den obigen Parallelversuchen über den Umfang der Empfindlichkeit dieser Reaktion. Sicherer aber möge folgende Versuchsreihe diese Proportionalität dartun.

Zu diesen Versuchen wurden die „Grundlösungen" aus reinem Cholesterin in Chloroform bei 15° hergestellt. Zur Verwendung gelangten je 2 Lösungen von verschiedenem Cholesteringehalt, deren Spektra nach der Herstellung der Cholestolreaktionsgemische aus je 1 ccm beider Grundlösungen, 2 ccm Acetanhydrid und 0,25 ccm „Essigschwefelsäure" (= 1 Tropfen H_2SO_4) paarweise unter den im ersten Teile dieser Arbeit für Oxycholesterin angegebenen optischen und experimentellen Bedingungen verglichen wurden[1]). Die Ausgleichung der Spektra der beiden Lösungen geschah durch vorsichtige Verdünnung der konzentrierteren Lösung bis zur Spektralintensität der dünneren mit Eisessig, und zwar gleichfalls nach den an der oben zitierten Stelle des ersten Teils dieser Arbeit für Oxycholesterin empfohlenen Regeln[2]).

Versuch A.

Grundlösung a mit 0,2170% reinen Cholesterins,
" a_1 " 0,1446% " "

Die nach obigen Angaben in zwei gleichen, gut verschließbaren Gläsern hergestellten und je 3,25 ccm betragenden Reaktionsgemische zeigten naturgemäß sehr verschiedene Spektralintensitäten. Und zwar

---

[1]) Vgl. diese Zeitschr. 48, 378, 380 ff.

[2]) Die experimentelle Technik und Methodik bei den spektralen Messungen der Cholestolreaktion sind völlig analog denen der Essigschwefelsäurereaktion des Oxycholesterins. Um die Übersichtlichkeit der Darlegungen nicht zu stören und Wiederholungen zu vermeiden, sei hier auf den wiederholt zitierten ersten Teil dieser Arbeit in dieser Zeitschr. 48, 373 bis 409 (Oxycholesterin) verwiesen, wo ja auch die Spektrometrie des Cholesterins wiederholt vorbereitend besprochen wurde.

war das Absorptionsspektrum im Glase a wesentlich intensiver als im Glase a_1. Sie wurden beide behufs Erhaltung gleicher Temperatur in ein Becherglas mit kaltem Wasser bis zur Entwicklung der höchsten Spektralintensität gestellt. Nach 2 Stunden wurde dann Gemisch a vor dem Vergleichsspektroskop (unter Vergleichung mit Gemisch a_1) nach und nach mit Eisessig verdünnt, bis sein Absorptionsspektrum (Streifen B—C im Rot) mit dem des Gemisches a_1 vollständig zusammenfiel, also die gleiche Intensität mit dem des anderen Gemisches erreichte, wobei es 1,65 ccm Eisessig verbrauchte. Es entstanden so aus Grundlösung a

Gemisch a_2: 4,90 ccm mit **0,0443 % Cholesterin**

und aus Grundlösung a_1

Gemisch a_3: 3,25 ccm mit **0,0445 % Cholesterin**.

Dieser Versuch wurde mit denselben Grundlösungen und in derselben Art 3 mal wiederholt, und zwar, wie ersichtlich, mit demselben Erfolg.

1. Wiederholung: Verdünnung des Gemisches a nach 2 Stunden mit 1,60 ccm Eisessig ergab:

Gemisch a_2: 4,85 ccm mit **0,0447 %** Cholesterin,
" a_3: 3,25 " " **0,0445 %** "

2. Wiederholung: Verdünnung nach drei Stunden mit 1,6 ccm Eisessig:

Gemisch a_2: 4,85 ccm mit 0,0447 % Cholesterin,
" a_3: 3,25 " " 0,0445 % "

3. Wiederholung: Verdünnung nach 3 Stunden mit 1,65 ccm Eisessig:

Gemisch a_2: 4,90 ccm mit 0,0443 % Cholesterin,
" a_3: 3,25 " " 0,0445 % "

Versuch B.

Grundlösung b mit 0,2170 % Cholesterin,
" b_1 " 0,1808 % "

Nach der Herstellung der Gemische und $3\frac{1}{2}$ stündigem Stehen wurde die Mischung der Lösung b mit Eisessig bis zur Spektralintensität des zweiten Gemisches verdünnt und verbrauchte dabei 0,65 ccm Eisessig. Es entstanden so aus Grundlösung b

Gemisch b_2: 3,90 ccm mit **0,05564 %** Cholesterin

und aus Lösung b_1

Gemisch b_3: 3,25 ccm mit **0,05563 %** Cholesterin.

Aus diesen vergleichenden Versuchen geht hervor, daß in zwei Reaktionsgemischen mit ungleichem Cholesteringehalt, die naturgemäß auch entsprechend ungleiche Spektralabsorptionen zeigen, mit der Ausgleichung der letzteren durch eine entsprechende Verdünnung der stärkeren Lösung auch der prozentuale Cholesteringehalt der Lösungen ausgeglichen wird.

Die Spektralintensität der Liebermannschen Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion (Cholestolreaktion) einer Cholesterinlösung ist also dem Cholesteringehalt der letzteren direkt proportional. (Vgl. Satz I, S. 218.)

2. Die Identität der Cholestolreaktion des Cholesterins mit der des Oxycholesterins[1])

möge aus folgenden vergleichenden Messungen der gegenseitigen gleichartigen Spektralabsorptionen hervorgehen.

Versuch C.

Grundlösung *c* (in Chloroform) mit 0,217 % **Cholesterin**,
" c_1 " " " 0,104 % **Oxycholesterin**.

Je 1 ccm beider Lösungen wurde in zwei gleichen in $^1/_{10}$ ccm graduierten Reagensgläsern von 12 mm Durchmesser mit je 2 ccm Acetanhydrid verdünnt und unter Kühlung mit je 2 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure vermischt. Nach $2^1/_2$ Stunden trat die höchste Intensität des letzten Stadiums der Reaktion in den Gemischen ein. Die entsprechende Spektralabsorption (*B*—*C* im Rot) im Glase *c* war bedeutend intensiver als im Glase c_1. Die stärkere Lösung wurde vor dem Vergleichsspektroskop (unter Vergleichung mit dem schwächeren Absorptionsspektrum der Lösung c_1) nach und nach bis zum völligen Ausgleich der beiden Spektralabsorptionen nach den oben angeführten Regeln mit Eisessig verdünnt, wobei 3,3 ccm dieses Mittels verbraucht wurden. Es entstanden so die Reaktionsgemische:

c_2: 6,4 ccm mit 0,0339 % **Cholesterin**,
c_3: 3,1 " " 0,0336 % **Oxycholesterin**.

Versuch D.

Grundlösung *d* mit 0,16275 % **Cholesterin**,
" d_1 " 0,10400 % **Oxycholesterin**.

Nach Herstellung der Reaktionsgemische mit je 1 ccm der Grundlösungen, 2 ccm Acetanhydrid und 0,25 ccm der oben empfohlenen Essigschwefelsäure (= 1 Tropfen H_2SO_4) und nach 2stündiger

[1]) Bei den oben auf S. 217 erwähnten colorimetrischen Bestimmungen der Cholesterinstoffe nehmen zwar die Autoren an, daß die Farbintensitäten aller in Betracht kommenden Cholesterinstoffe die gleichen seien. Mag dies auch in dieser Hinsicht zutreffend sein, so ließe sich hieraus doch kein sicherer Schluß auf die allseitigen Spektralintensitäten dieser Stoffe ziehen, da, wie wiederholt hervorgehoben wurde, Farbe und Spektrum hier nicht immer Hand in Hand gehen. Ich habe es daher für nötig erachtet, den experimentellen Beweis für die Identität beider Spektralreaktionen zu erbringen.

Reaktionsentwicklung wurden die ungleichen Absorptionsspektra (*B*—*C* im Rot) der je 3,25 ccm betragenden Lösungen in angegebener Weise durch Verdünnung des stärkeren Gemisches *d* mit 1,8 ccm Eisessig ausgeglichen. Es entstanden die Gemische:

d_2: 5,05 ccm mit 0,0322 % **Cholesterin**,
d_3: 3,25 „ „ 0,0320 % **Oxycholesterin**.

Nach 8 Stunden, wo die ausgeglichenen Absorptionsspektra schon am Schwinden waren, war in der Spektralgleichheit keine Änderung eingetreten.

Versuch E.

Grundlösung *e* mit 0,1085 % Cholesterin,
„ e_1 „ 0,1040 % Oxycholesterin.

Herstellung der Reaktionsgemische mit Acetanhydrid usw.: wie in den beiden vorhergehenden Versuchen C und D. Entwicklungsdauer der Absorptionsspektra: 2 Stunden.

Verdünnung der nur wenig stärkeren Lösung *e*: 0,10 ccm Eisessig. Es entstanden die Gemische:

e_2: 3,35 ccm mit 0,03238 % **Cholesterin**,
e_3: 3,25 „ „ 0,03200 % **Oxycholesterin**.

Bei der Wiederholung dieses Versuches mit denselben Grundlösungen und unter denselben sonstigen Bedingungen erforderte das etwas stärkere Gemisch *e* an Verdünnungsmittel: 0,20 ccm, so daß das Gemisch e_2 3,45 ccm betrug mit 0,0314 % Cholesterin. Die beiden Versuche geben also im Mittel:

Gemisch e_2: 3,40 ccm mit 0,0319 % **Cholesterin**
gegenüber
„ e_3: 3,25 „ „ 0,0320 % **Oxycholesterin**.

Nach 24 Stunden waren bei diesem Versuch in beiden fast schon verblaßten Gemischen die Spektralabsorptionen (bei *B* im Rot) noch als sehr schmale durchsichtige Streifen ganz deutlich und sicher wahrnehmbar, haben aber in ihrer Intensitätsgleichheit keine Veränderung erlitten.

Um die hier erörterte Identität der fraglichen Cholestolreaktionen möglichst nach allen Seiten hin zu beleuchten, war es von Interesse, auch beim Oxycholesterin, wie oben beim Cholesterin, die Lage des Umfangs der Minimalspektra (Grenzspektra) der beiden letzten Phasen seiner Cholestolreaktion zu prüfen. Diese Prüfung wurde genau so ausgeführt wie bei der Feststellung derselben „Grenzspektra" des Cholesterins[1]). Es ergaben sich hier beim Oxycholesterin folgende Daten: Die Minimalabsorption des vorletzten Stadiums der Cholestolreaktion (im Orange und Gelb) lag bei 0,00911 % Oxycholesterin des Reaktionsgemisches. Mithin hatte dieses Stadium die Empfindlichkeit von 1:10976.

[1]) Vgl. oben S. 224 u. 225.

Die Minimalabsorption des letzten Stadiums (im Rot) lag bei 0,00903 $^0/_0$ Oxycholesterin. Mithin beträgt die Empfindlichkeit dieses Stadiums 1 : 11740.

Diese Empfindlichkeitswerte liegen beim Cholesterin durchschnittlich ebenfalls zwischen 1 : 10000 und 1 : 12000 (siehe diese).

Aus allen diesen bei den obigen vergleichenden Versuchen mit Cholesterin und Oxycholesterin erhaltenen, befriedigend übereinstimmenden Zahlen und Daten dürfte wohl die Identität der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion („Cholestolreaktion") des Oxycholesterins mit der des Cholesterins klar hervorgehen. (Vgl. Satz II, S. 218.)

Hieraus ergibt sich, daß man durch vergleichende Messungen der spektralen Absorptionsintensität der Cholestolreaktion in einem Gemisch von Cholesterin und Oxycholesterin an dem Spektrum einer Testlösung aus reinem Cholesterin die volle Summe dieser Verbindungen ermitteln kann. Bestimmt man nun in einer anderen Portion der Chloroformgrundlösung desselben Gemisches das darin enthaltene Oxycholesterin vermittels der spektrometrischen Messung seiner Essigschwefelsäure-Eisenchlorid-Reaktion an der einer Testlösung aus reinem Oxycholesterin und zieht den dabei gewonnenen Wert von jener Summe ab, so ergibt die Differenz den eigentlichen Cholesteringehalt des betreffenden Gemisches.

Die nachstehenden Beispiele bestätigen diese Schlußfolgerung.

IV.

Spektrometrische Bestimmung des Cholesterins neben Oxycholesterin.

Für die nachstehenden Versuche wurde ein Gemisch hergestellt, bestehend aus 67,6 $^0/_0$ reinen Cholesterins und 32,4 $^0/_0$ gereinigten, cholesterinfreien Oxycholesterins[1]). Die Gesamtcholestolreaktion dieses Gemisches wurde an der Cholestolreaktion des reinen Cholesterins und seine Essigschwefelsäurereaktion an derselben Reaktion des gereinigten Oxycholesterins spektrometrisch gemessen.

[1]) Das Oxycholesterin wurde hergestellt und gereinigt nach dem im ersten Teile dieser Arbeit (Kap. II) beschriebenen Verfahren (diese Zeitschr. 48, 400 bis 406).

Versuch F.

Cholesterinbestimmung im obigen Gemisch vermittels der Cholestolreaktion.

Grundlösung f (in Chloroform) mit 0,1605% des obigen Cholesteringemisches.

Grundlösung f_1 (in Chloroform) mit 0,2170% reinen Cholesterins.

Je 1 ccm der beiden Lösungen wurde, wie bei den vorhergehenden Messungen, in den passenden Reagensgläsern mit je 2 ccm Acetanhydrid verdünnt und je 0,25 ccm „Essigschwefelsäure" (= 1 Tropfen H_2SO_4) vermischt. Die höchste Reaktionsintensität fiel in beiden Lösungen nach $3^1/_2$ Stunden in das letzte (dritte) Stadium der Reaktion mit seinem Absorptionsstreifen „B — C" im roten Spektralfelde. Die Spektralabsorption im Glase f_1 war wesentlich intensiver als die in f. Das erstere Reaktionsgemisch (f_1) wurde daher nach und nach vor dem Vergleichsspektroskop (unter Vergleichung mit dem schwächeren Spektrum der Lösung f) bis zur völligen Spektralgleichheit mit Eisessig verdünnt. Es wurden dabei 1,10 ccm dieses Mittels verbraucht. Es entstanden dabei die Reaktionsgemische:

f_2 : 3,25 ccm mit 0,04938% Cholesteringemisches und

f_3 : 4,35 ccm mit 0,04988% reinen Cholesterins.

Mithin beträgt der „scheinbare" Cholesteringehalt des Gemisches 101,0%.

Der Beobachtungsfehler belief sich also bei diesem Versuch auf 1,0% vom Cholesterin-Oxycholesteringemisch.

Durch eine Reihe weiterer Analysen mit denselben Grundlösungen reduzierte sich dieser Fehler auf einen Durchschnitt von 0,5% vom Gemisch.

Auch bei diesen Versuchen war die Spektralgleichheit selbst nach 20 Stunden, wo die beiden Gemische nur noch grünlichgelb aussahen, die verblaßten Absorptionsspektra aber im Rot (bei B) noch deutlich wahrnehmbar waren, unverändert.

Versuch G.

Oxycholesterinbestimmung im obigen Gemisch vermittels der Essigschwefelsäurereaktion.

Analyse 1. Diese und die darauffolgende Analyse wurden genau so ausgeführt, wie im ersten Teile dieser Arbeit beschrieben[1]), mit dem einzigen Unterschied, daß hier die 8 Tropfen Schwefelsäure nicht zu den Chloroform-Eisessiglösungen der Substanzen zugegeben, sondern dem Reaktionsgemische so beigebracht, daß die betreffenden zu vergleichenden Chloroformgrundlösungen direkt mit der entsprechenden Menge der oben empfohlenen „Essigschwefelsäure" verdünnt wurden. Man arbeitet also vorteilhaft mit demselben gut haltbaren Reagens (natürlich in den

[1]) Diese Zeitschr. 48, 378 bis 381.

entsprechenden Mengen) anstatt mit der lästigen freien Schwefelsäure: bei der Essigschwefelsäurereaktion auf Oxycholesterin, wie bei der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion auf Cholesterinstoffe.

Grundlösung g mit 0,1605 % des obigen Cholesterin-Oxycholesteringemisches.

Grundlösung g_1 mit 0,1040 % Oxycholesterins.

Je 1 ccm der beiden Lösungen wurden mit je 2 ccm „Essigschwefelsäure“ (= 8 Tropfen H_2SO_4) verdünnt. Die Oxycholesterinreaktion tritt nach wenigen Sekunden mit kirsch- oder violettroter, bald blau werdender Farbe ein und erreicht, wie man sich durch das Spektroskop an der starken Absorption im Gelb und Grün des Spektrums überzeugen kann, nach 5 bis 10 Minuten das höchste Entwicklungsstadium (zweites, vorletztes Stadium). Es wurden dann zu beiden Reaktionsgemischen je 2 Tropfen 5 % iger Eisenchloridlösung (in Eisessig) zugegeben, worauf die blaue Farbe rasch in ein reines Grün überging, das heißt in das dritte (letzte) Reaktionsstadium, und zwar mit seiner höchsten Spektralintensität. Diese war im Glase g_1 bedeutend intensiver als im Glase g. Ersteres Gemisch wurde daher vor dem Spektroskop (unter Vergleichung mit dem zweiten schwächeren Gemisch) bis zur völligen Spektralgleichheit mit Eisessig verdünnt, wobei 3,20 ccm des Mittels verbraucht wurden.

Es entstanden dadurch die Reaktionsgemische: aus Lösung g

g_2 : 3,05 ccm mit 0,05262 % Cholesterin-Oxycholesteringemisch

und aus Lösung g_1

g_3 : 6,25 ccm mit 0,01664 % reinen Oxycholesterins.

Mithin beträgt der ermittelte Oxycholesteringehalt des Gemisches 31,6 %. (Zur Anwendung bei der Zusammenstellung des Gemisches gelangten 32,4 % Oxycholesterin.)

Analyse 2. Bei der Wiederholung der obigen Analyse 1 mit denselben Grundlösungen und unter denselben Bedingungen erforderte das Reaktionsgemisch der stärkeren Lösung g_1 zur Ausgleichung seiner Spektralintensität mit der des zweiten schwächeren Reaktionsgemisches 3,0 ccm Eisessig zu seiner Verdünnung. Es entstanden nunmehr die Reaktionsgemische:

g_2 : 3,05 ccm mit 0,05262 % des obigen Cholesteringemisches,

g_3 : 6,05 ccm mit 0,01719 % des reinen Oxycholesterins.

Mithin betrug diesmal der ermittelte Oxycholesteringehalt des Cholesteringemisches 32,7 %.

Das Mittel der beiden Analysen ist also 32,15 % gegen das angewandte Oxycholesterin 32,40 %.

Zieht man nun diesen für Oxycholesterin gewonnenen Durchschnittswert (32,15 %) von dem oben gefundenen durchschnittlichen scheinbaren Prozentgehalt (100,5 %) des Gemisches an Cholesterin ab, so ergibt sich für das Gemisch ein wirklicher Cholesteringehalt

von 68,35 % gegen die für diese Mischung effektiv verwendeten 67,6 % Cholesterin. Der Beobachtungsfehler betrug demnach für Cholesterin 0,75 % und für Oxycholesterin 0,25 % vom Gemisch.

Aus dem bisher Gesagten dürften wohl die zwei oben (Seite 218) ausgesprochenen Sätze von der Proportionalität der Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion zu dem Prozentgehalt der Cholesterinstoffe im Reaktionsgemisch und der Identität dieser Reaktion bei verschiedenen (miteinander verwandten) Cholesterinstoffen, sowie die daraus gezogenen Schlußfolgerungen (Seite 218 und Seite 230) als hinreichend begründet erscheinen.

Nach den oben erörterten Grundsätzen und Regeln sind seit geraumer Zeit auch in den unverseifbaren Anteilen der tierischen Fette und Wachsarten Cholesterin für sich sowie Oxycholesterin und Cholesterin nebeneinander spektrometrisch bestimmt worden. In denjenigen Fällen, wo Oxycholesterin gänzlich fehlte, oder nur in geringen Mengen neben dem Cholesterin vorhanden war (z. B. in der Leber), ist letzteres wiederholt zur Kontrolle auch gewichtsanalytisch vermittels Fällung mit Digitoninlösung bestimmt worden und ergab regelmäßig befriedigend übereinstimmende Werte.[1])

Soweit die Bestimmungen der genannten Cholesterinstoffe für sich bzw. nebeneinander im **Unverseifbaren der Fette und Wachsarten.**

V.

Bestimmungen der freien Cholesterinstoffe neben deren Estern.

Wie oben S. 219 angedeutet wurde, ist die Liebermannsche Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion („Cholestolreaktion") in der Kälte mit der von Burchard durch Zusatz von Chloroform variierten Reaktion insofern nicht identisch, als die ursprüngliche Liebermannsche Reaktion auf die Cholesterin-Ester der höheren Fett- oder Wachsfettsäuren nicht anwendbar ist, weil sie hier nur sehr geringe oder gar keine Färbungen gibt; bestenfalls aber solche, die hinsichtlich ihrer Spektralabsorptionen die Reaktion als negativ erscheinen lassen können.

Verseift man diese Cholesterin-Ester, so tritt auch die Liebermannsche Reaktion am Verseifungsprodukt mit voller Schärfe wieder ein.

---

[1]) Vgl. auch diese Zeitschr. 48, 383 und 52, 209.

Welche Ursache dieser negativen Seite der genannten Reaktion zugrunde liegt: ob es die sehr schwere Löslichkeit der erwähnten Ester in Acetanhydrid ist, oder ob auch andere Eigentümlichkeiten hier mit im Spiele sind, soll in einer späteren Mitteilung nach Abschluß der betreffenden Untersuchungen erörtert werden. Hier soll vorläufig nur mit der Tatsache gerechnet werden, daß das als Ester an höhere Fettsäuren gebundene Cholesterin für die spektrometrische Analyse vermittels der ursprünglichen Liebermannschen Cholestolreaktion entweder gänzlich, mindestens aber zum allergrößten Teil ausgeschaltet werden kann. Da nun die Liebermann-Burchardsche Reaktion, das heißt die Chloroform-Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion, auch bei den genannten Cholesterin-Estern mit großer Schärfe aufzutreten pflegt, so benutze ich orientierungsweise diese letztere Reaktion zur spektrometrischen Ermittelung des Gesamtcholesterins der Fette und Wachsarten, ohne sie erst zu verseifen, während mir die reine Acetanhydrid-Schwefelsäurereaktion zur Bestimmung des freien Cholesterins dient. Die Differenz der beiden Bestimmungen ergibt annähernd die Menge des als Ester gebundenen Cholesterins.

Zum Studium des Verfahrens eignet sich gut das an Cholesterinstoffen und deren Estern reichhaltige Blutfett oder das zugänglichere gereinigte neutrale Wollfett (Adeps lanae, Lanolin). Man verfährt zweckmäßig wie folgt:

1,0 g eines gereinigten Wollfettes wird mit etwa 30 ccm Acetanhydrid tüchtig durchgekocht, unter häufigem Umrühren unter einem kalten Wasserstrahl abgekühlt und die stark trübe Flüssigkeit auf Eis gestellt. Nach etwa einer Stunde wird das zum großen Teil krümelig abgeschiedene Fett abfiltriert, mit kaltem Acetanhydrid gut ausgewaschen und das klare Filtrat mit demselben Mittel auf 100 ccm aufgefüllt. Diese Lösung wird spektrometrisch in der wiederholt geschilderten Weise mit einer Lösung von reinem Cholesterin in Acetanhydrid verglichen und aus dem gemessenen Verdünnungszustand[1]) der Lösungen der Cholesteringehalt des Fettes berechnet.

---

[1]) Es empfiehlt sich, in diesem Falle zur Verdünnung der stärkeren Lösung behufs Ausgleichung ihrer Spektralabsorption mit der des schwächeren Gemisches nur Eisessig oder (nötigenfalls) Acetanhydrid, aber kein Chloroform zu verwenden.

In einem derartig behandelten Adeps lanae des D. A.-B. betrug dieser Cholesteringehalt **3,5 %** vom angewandten Fett.

Nun wird eine 0,5 %ige Lösung desselben Fettes in Chloroform neben einer 0,2 %igen Lösung von reinem Cholesterin in demselben Lösungsmittel hergestellt. Je 1 ccm der beiden Lösungen wird mit je 2 ccm Acetanhydrid und je 1 Tropfen Schwefelsäure vermischt und wie oben angegeben im höchsten Entwickelungsstadium der letzten Reaktionsphase am Vergleichsspektroskop miteinander verglichen resp. ausgeglichen.

Im obigen Falle berechnete sich nunmehr der Gesamtcholesteringehalt des Fettes auf **21,0 %**.

Demnach ergab dieses neutrale Wollfett:

nach Liebermann-Burchardt . .	21,0 %	Cholesterinstoffe
„ Liebermann	3,5 %	„
Differenz	17,5 %	Cholesterinstoffe.

Diese Zahlen stimmen auch annähernd gut mit der Erfahrung, wonach die gereinigten Wollfette 3 bis 4 % freier und 16 bis 18 % als Ester gebundener Cholesterinstoffe enthalten.

Auf die etwaige Verwendbarkeit dieses Verfahrens für genauere quantitative Zwecke werde ich nach Abschluß dieser Untersuchungen in einer späteren Mitteilung zurückkommen.

Über die Beeinflussung des Glykogenschwundes in autonomen Organen des Frosches durch Anoxybiose.

Von

Ernst J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten Mannheim.)

(Eingegangen am 9. Juli 1913.)

Unter „autonomen Organen" verstehe ich Zellsysteme, wie Leberlappen, oder Muskeln, die aus dem möglichst rasch getöteten Tiere unter möglichster Vermeidung von Verletzungen herausgeschnitten sind. Als „autonome" können diese Organe bezeichnet werden, weil sie weder vom Zentralnervensystem aus noch durch von anderen Organen gebildete sogenannte „Hormone" im Wege der Zirkulation beeinflußbar sind. Der Begriff „autonomes Organ" ist an Stelle des früher benutzten „überlebendes Organ" zu setzen. Es ist nämlich unmöglich zu sagen, in welchem Augenblick ein Organ aufhört, ein überlebendes zu sein. Ebensowenig ist es möglich, zu sagen, ob alle Zellen des Organs noch überlebend sind. Versuche an autonomen Organen — gleichgültig ob diese künstlich durchströmt und von den Gefäßen aus mit Sauerstoff versorgt werden oder nicht — wird man möglichst kurz dauern lassen. Je länger der Versuch dauert, desto größer wird der Umfang irreversibler Prozesse sein, die das autonome Organ immer weniger mit dem im lebenden Tiere befindlichen vergleichbar machen werden.

Autonome Organe müssen während des Versuches mit Sauerstoff versorgt werden. Wahrscheinlich ist es auch von Wichtigkeit, die entstehende Kohlensäure zu entfernen. Dies kann durch Einleitung einer künstlichen Zirkulation geschehen. Wenn man indessen kleine, dünne Organe mit großer Oberfläche benutzt, so kann, wie Usui[1]) gezeigt hat, eine mehr

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 147, 100.

oder minder große Zahl von Zellen von der Oberfläche her ohne Einleitung einer künstlichen Zirkulation in Oxybiose versetzt werden. Eine Sicherheit, daß wirklich alle Zellen sich in reiner Oxybiose während der ganzen Versuchsdauer befinden, hat man auch bei künstlicher Durchströmung nicht. Das beste Kriterium ist dafür wohl die Konstanz der Oxydationsgeschwindigkeit (Masing an der Kaninchenleber)[1]). Usui hat gezeigt, daß diese auch bei kleinen nicht von den Gefäßen, sondern von der Oberfläche her mit Sauerstoff versorgten autonomen Organen vorhanden sein kann. Er hat die Sauerstoffzufuhr durch Zugabe von roten Blutkörperchen und Bewegung des Versuchsgefäßes bewirkt. Ich bin so verfahren, daß die autonomen Organe in Ringerlösung suspendiert waren, durch die ein kontinuierlicher Strom von Bombensauerstoff oder reinem Stickstoff geleitet wurde, bei einer Temperatur von 22 bis 24°. Die Dauer der Versuche schwankte zwischen 2 und 5 Stunden. Im übrigen verweise ich bezüglich der Methode auf frühere Mitteilungen in der Zeitschrift für Biologie Bd. 60, S. 371 und in dieser Zeitschrift Bd. 52, S. 471.

Die Grundlage für die Frage, ob sich ebenso wie am ganzen Tiere am autonomen Organ eine Beeinflussung des Glykogenschwunds durch Anoxybiose nachweisen läßt, bildet die Feststellung, daß sich der Glykogenschwund im autonomen Organ bei Sättigung der umgebenden Ringerlösung mit Sauerstoff in verschiedenen Jahreszeiten ganz verschieden verhält, wenn man den Versuch nicht über $5^1/_2$ Stunden ausdehnt und Temperaturen von höchstens 25° wählt. Die Ergebnisse zweier Versuchsreihen an autonomen Lebern im Sommer und im Winter, (die zum Teil schon früher mitgeteilt wurden) sind in Tabelle I und II zusammengestellt. Es zeigt sich, daß in den Wintermonaten im Mittel eine Abnahme von 0,25 g Glykogen pro 100 g Leber stattfindet, die einer Abnahme von nur 2°/₀ des Anfangsglykogens entspricht. Werden auch die unter etwas abweichenden Bedingungen am 6. II. und 9. I. 1913 angestellten Versuche mit einbezogen, so beträgt die Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber nur 0,166 g oder 1,5°/₀ des Anfangsglykogens. Von den zwei unter abweichenden Bedingungen bzw. mit zu geringen Lebergewichten angestellten Versuchen abgesehen,

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 1912, 431.

zeigen 4 von 6 Versuchen eine Abnahme des Glykogens, einer ein Gleichbleiben, ein weiterer eine Zunahme des Glykogens. Von den Abnahmen überschreitet nur der Versuch vom 10. XII. die Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode deutlich. Zieht man dies in Betracht, sowie vor allem den Umstand, daß es unmöglich ist, bei der Präparation der Leberlappen eine mechanische Verletzung von Zellen vollständig zu vermeiden — mechanisch verletzte Zellen verlieren aber, wie früher gezeigt wurde, auch im Winter in 4 Stunden etwa 50 $^0/_0$ ihres Glykogens —, so ist man zu der Annahme berechtigt, daß in unverletzten Leberzellen im Winter bei Gasdurchleitung eine Abnahme des Glykogens in 4 Stunden bei 24° nicht stattfindet.

Unter den gleichen Bedingungen findet, wie Tabelle II zeigt, im Sommer eine beträchtliche Abnahme des Glykogens statt. Sie beträgt im Mittel 1,181 g pro 100 g Leber oder 19,1 $^0/_0$ des Anfangsglykogens. Sie kann im Einzelversuch absolut bis 1,72 g pro 100 g Leber betragen. In Prozenten des Anfangsglykogens kann die Abnahme bis 44,5 $^0/_0$ ausmachen. Die Glykogenabnahme in der autonomen Leber im Sommer verhält sich zu der im Winter etwa wie 5 zu 1. Dabei ist es gleichgültig, daß die Menge des Glykogens in der Sommerleber normalerweise sehr viel geringer ist als in der Winterleber. Man kann sich durch geeignete Vorbehandlung der Tiere auch im Juni Lebern von 14 $^0/_0$ Glykogengehalt herstellen[1]). Vergleicht man 2 Versuche mit Lebern nahezu gleichen Glykogengehaltes im Januar und im Juni, so ergibt sich:

Datum	In 100 g Leber Glykogen in g		Glykogenabnahme	
	Zu Beginn des Versuches	nach 4^h O_2 durchströmt	pro 100 g Leber in g	in $^0/_0$ des Anfangsglykogens
4. I. 13	14,84	14,61	0,23	1,6
3. VI. 13	14,44	12,72	1,72	11,85

das heißt bei gleichem Anfangsgehalt an Glykogen nimmt unter sonst gleichen Bedingungen das Glykogen in der Sommerleber etwa um das 7fache der Abnahme in der Winterleber ab.

[1]) Über eine Reihe derartiger Versuche, welche die Beziehungen zwischen Konzentration des Glykogens und Glykogenschwund im autonomen Organ behandeln, wird in kurzem berichtet werden.

Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß die Abnahme der Winterleber in den Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode liegt. Früher ist gezeigt worden, daß diese Differenz zwischen Sommer- und Winterleber dadurch bewirkt wird, daß in der autonomen Winterleber das Zusammentreffen von Diastase und Glykogen in der intakten Zelle nicht vor sich geht, obwohl reichlich Diastase in der Zelle vorhanden ist.

Hier interessiert nur die Frage: Ist es im Winter möglich, durch Anoxybiose im autonomen Organ ein Verschwinden des Glykogens (wie im lebenden Tiere) hervorzurufen, und wird der im Sommer bereits oxybiotisch vorhandene Glykogenschwund im autonomen Organ durch Anoxybiose beschleunigt? Die zur Entscheidung dieser Frage in verschiedenen Jahreszeiten angestellten Versuche sind in Tabelle III bis VI zusammengestellt.

Die Methodik dieser Versuche war genau die gleiche wie die der übrigen. Nur wurde bei dem anoxybiotischen Versuch durch die Ringerlösung reiner Stickstoff geleitet. Die mit Sauerstoff und Stickstoff behandelten Leberlappen stammen natürlich von denselben Tieren. Sie waren genau gleiche Zeit in Eis und im Wasserbad; ebenso wurde bei der Glykogenanalyse ganz gleichmäßig verfahren.

Tabelle III zeigt die im Winter angestellten Versuche. Der Mittelwert der oxybiotischen und anoxybiotischen Lebern differiert nur um 0,074 g Glykogen pro 100 g Leber oder um 0,63 % des Gehaltes der oxybiotischen Leber. Diese Größe liegt in den Fehlergrenzen der Bestimmungsmethoden, und dementsprechend liegen auch die Einzelwerte bald in den oxybiotischen, bald in den anoxybiotischen Leberlappen höher. Die größte Abweichung zwischen beiden beträgt 3,7 % des Anfangsgehaltes. Die Mehrzahl der Versuche ist in den Monaten November und Dezember angestellt, aber Rana esculenta weist noch am 17. März den gleichen Befund auf. Es ergibt sich also, daß in der gleichen Jahreszeit, in der im autonomen Organ kein Glykogenschwund feststellbar war (siehe Tabelle I), auch keine Beeinflussung durch Anoxybiose im autonomen Organ möglich ist. Im November und Dezember ist es gleichgültig, ob man die Organe mit Sauerstoff oder Stickstoff durchströmt. Unter meinen Versuchsbedingungen bleibt in beiden Fällen das Glykogen stabil.

Tabelle IV führt die an Rana fusca im Februar und März angestellten Versuche auf. Sie zeigt, daß um diese Jahreszeit durch Anoxybiose im Mittel 0,289 g Glykogen pro 100 g Leber zum Verschwinden gebracht werden, oder 8,77 % des in den oxybiotischen Lebern enthaltenen Glykogens. Die größte prozentische Abnahme beträgt 11,8 % im Einzelversuch, die kleinste 3,8 %. Nur einmal findet sich eine so kleine Abnahme durch Anoxybiose, die schon fast in den Fehlergrenzen liegt. Alle übrigen liegen außerhalb der Fehlergrenze und alle Versuche verlaufen einsinnig. Von Interesse ist es, daß bei Rana esculenta in dem am 17. März angestellten Versuch sich ein ganz anderes Verhalten zeigt. Es beweist dies, daß die hier gefundenen Differenzen mit den Lebensgewohnheiten der Tiere zusammenhängen. Rana esculenta erwacht etwa 4 Wochen später aus dem Winterschlaf als Rana fusca. Ebenso geht bei Esculenta die Begattung ein bis zwei Monate später vor sich.

Tabelle V zeigt den Einfluß der Anoxybiose in autonomen Lebern von Rana esculenta im April und Mai, in der Zeit nach dem Erwachen aus dem Winterschlaf bis etwa zur Begattung der Tiere. Das Ergebnis ist nahezu identisch mit dem 2 Monate früher bei Rana fusca erhaltenen. Auch die Mittelwerte sind fast dieselben, 0,291 g Abnahme durch Anoxybiose Glykogen pro 100 g Leber oder 7,2 % der oxybiotischen Lebern. Bei den in dieser Tabelle mitgeteilten Versuchen wurde nun gleichzeitig der Anfangsgehalt der Lebern an Glykogen untersucht, indem die Mittellappen sofort nach Entnahme aus dem Eis, die Seitenlappen 4 Stunden später nach Durchströmung mit Sauerstoff bzw. Stickstoff analysiert wurden. Die betreffenden Glykogenwerte sind in Tabelle II mitgeteilt. Zieht man aus ihnen das Mittel, so ergibt sich: Die Leber enthielt zu Beginn des Versuches 5,2003 g Glykogen in 100 g Leber. Nach Oxybiose 4,003 g Glykogen, nach Anoxybiose 3,712 g Glykogen. Die oxybiotischen Lebern hatten demnach um 1,200 g abgenommen, die anoxybiotischen um 1,491 g. Die durch Anoxybiose bewirkte Zunahme des Glykogenschwundes beträgt also 24 % der oxybiotischen. Wenn dies mit den Versuchen am ganzen Tier verglichen werden darf, so ergibt sich keine wesentliche Differenz. Indessen ist ein solcher Vergleich wohl kaum statthaft. Nur das beweist er, was ja in gleicher

Weise aus den Versuchen von Masing und von Neubauer[1]) hervorgeht, daß der anoxybiotische Glykogenschwund durch Veränderungen in den Zellen selbst bewirkt wird, nicht durch Einflüsse vom zentralen Nervensystem aus oder durch Hormone, die in anderen Organen entstehen, als diejenigen sind, in denen der oxybiotische Glykogenschwund stattfindet.

Tabelle VI zeigt die gleichen Verhältnisse im Monat Oktober. Auch hier weisen 4 von 3 Versuchen einen anoxybiotischen Glykogenschwund auf, der außerhalb der Fehlergrenzen liegt[2]). Der Mittelwert liegt entsprechend dem hohen Gehalt der Leber an Glykogen höher, als in den Frühjahrsversuchen. Er beträgt 0,86 g Glykogen pro 100 g Leber oder 5,9 % des Glykogengehaltes der oxybiotischen Leber. Leider besitze ich für diese Jahreszeit noch keine Versuche über den oxybiotischen Glykogenschwund im autonomen Organ. Es ist wünschenswert, im September und Oktober eine ähnliche Versuchsreihe wie die in Tabelle V und Tabelle II mitgeteilte noch anzustellen.

Die bisher mitgeteilten Versuche ergeben also, daß in den Jahreszeiten, in denen das Glykogen im autonomen Organ labil ist, eine Beeinflussung durch Anoxybiose deutlich ist. In den Jahreszeiten, in denen das Glykogen im autonomen Organ stabil ist, kann man dagegen durch Anoxybiose im autonomen Organ keinen Glykogenschwund hervorrufen. Daraus, scheint mir, muß geschlossen werden, daß die Labilität des Glykogens im autonomen Sommerorgan nicht durch ungenügende Sauerstoffversorgung entsteht.

Es wird vielfach angenommen, auf Grund des von Claude Bernard entdeckten Zuckerstiches, daß die Hydrolyse des Glykogens in der Leber in besonderer Weise vom Zentralnervensystem aus beeinflußt wird. Dem gegenüber erscheint es von Wichtigkeit, daß bezüglich der Stabilität des Glykogens und der Beeinflussung des Glykogenschwundes durch Anoxybiose in verschiedenen Jahreszeiten sich im Muskel genau dieselben Verhältnisse finden wie in der Leber, wenn das autonome Organ mit der gleichen Versuchsanordnung untersucht wird. Die diesbezüglichen Versuche sind in der Tabelle VII bis IX aufgeführt.

Zu diesen Versuchen dienten zum größten Teil die Gastro-

[1]) Diese Zeitschr. 43, 335, 1912.

[2]) Diese Versuche hat Herr Dr. med. Grode ausgeführt.

knemien, zum kleineren Teil die am Becken abgetrennten ganzen Hinterschenkel. Die Tabelle VII zeigt (wie schon früher mitgeteilt) die Stabilität des Glykogens im autonomen Organ in der Zeit von November bis Anfang März. Im Mittel ergibt sich bei 4stündigem Verweilen bei 22° und Sauerstoffdurchleitung eine Abnahme von 0,0188 g Glykogen pro 100 g Muskel, oder 1,6 % des Anfangsglykogens. Nur in einem Falle am 10. XII. überschreitet die Abnahme deutlich die Fehlergrenzen. Von Interesse ist es, daß am 7. III. zu einer Zeit, wo das Leberglykogen bei Rana fusca bereits labil geworden ist, das Muskelglykogen noch stabil sein kann. Die Sommerversuche, die in der Zeit von April bis Juni angestellt sind, zeigen sämtlich eine beträchtliche Abnahme des Glykogens unter den gleichen Bedingungen. Diese beträgt im Mittel 18,5 % des Anfangsglykogens und 0,065 g Glykogen pro 100 g Organ. Während bei der Leber die absolute Glykogenabnahme im Sommer etwa das 5fache von der im Winter betrug, ist dieser Wert beim Muskel im Sommer etwa das $3^1/_2$fache des Winterwertes. Indessen ist ein genauerer Vergleich nicht möglich, denn der höchste Glykogengehalt im Muskel liegt mit 1,3 % immer noch bedeutend niedriger als selbst der niedrigste Leberwert. Die Tabellen VIII und IX zeigen die Beeinflussung des Glykogenschwundes im autonomen Organ durch Anoxybiose. Sie ergeben genau das gleiche Verhalten wie die mit Leberlappen angestellten Versuche. Auch hier ist im November und Dezember keine Beeinflussung durch Anoxybiose nachweisbar. Im Mittel weichen die anoxybiotischen Muskeln nur um 0,7 % vor den oxybiotischen ab, während Rana fusca im März um 7,3 %, Esculenta in den Monaten April bis Juni um 15 % und im September um 14 % weniger Glykogen in den mit Stickstoff durchströmten Muskeln enthält als in den mit Sauerstoff durchströmten. Von den zahlreichen angestellten Versuchen (im ganzen 22) verlaufen alle bis auf einen am 26. III. an Fusca angestellten einsinnig; wodurch diese eine Abweichung verursacht ist, kann ich nicht sagen. Ein Fehler bei der Analyse ist mir nicht bemerkbar geworden. Am 7. V. und 10. IV. 1912 wurden gleichzeitig Versuche an vorher gleichbehandelten Fröschen angestellt, bei denen einerseits die Abnahme des Glykogens durch Oxybiose, andererseits die Ab-

nahme durch Anoxybiose festgestellt wurde. Dabei ergab sich im Mittel aus beiden Versuchen, daß die oxybiotischen Schenkel zu Anfang des Versuches 0,439 % Glykogen enthielten. Nach 4 stündiger Behandlung mit Sauerstoff enthielten sie noch 0,3725 % Glykogen. Die oxybiotische Abnahme betrug also 0,0665 g Glykogen pro 100 g Schenkel. Die anoxybiotischen Muskeln enthielten im Mittel aus beiden Versuchen zu Anfang 0,4475 % Glykogen und nach 4 stündigem Verweilen im Stickstoffstrome 0,335 % Glykogen. Sie hatten also um 0,1125 g Glykogen abgenommen, d. h. um 69 % mehr als die oxybiotischen, während bei der Leber die Mehrabnahme durch Anoxybiose 24 % der oxybiotischen betrug.

So zeigt also der Muskel im wesentlichen genau das gleiche Verhalten wie die Leber: im Winter Stabilität des Glykogens und keine Beeinflussung durch Anoxybiose, im Sommer Labilität des Glykogens und Beeinflussung durch Anoxybiose im autonomen Organ, wobei stets Versuchszeiten von höchstens 4 Stunden und Temperaturen zwischen 20 und 25° benutzt werden müssen.

Die von mir gefundene Stabilität des Muskelglykogens im Winter gestattet vielleicht, die Frage nach dem Zusammenhang zwischen Muskelarbeit und Glykogenverbrauch zu klären. Zu diesem Zwecke sind häufig herausgeschnittene Schenkel bis zur völligen Erschöpfung tetanisiert worden. Man hat dann meist einen Glykogenschwund gefunden, der im Vergleich zu der geleisteten mechanischen Arbeit ganz kolossal war[1]). Eine Tetanisierung bis zur Erschöpfung, überhaupt eine Reizungsart, bei der es zu deutlicher Ermüdung des Muskels kommt, kann zur Behandlung der Frage nach der Quelle der Muskelkraft in keiner Weise dienen, da Ermüdung des Muskels nichts anderes heißt als Versetzung unter Anoxybiose bei gleichzeitiger Anhäufung von Milchsäure im Muskel. Ich habe einen vorläufigen Versuch in dieser Richtung angestellt, der ein vollständig anderes Resultat ergeben hat. Am 19. II. 1913 wurden bei einer Durchschnittstemperatur von 11,8° im Zeitraum von 5 Stunden die 8 rechten Schenkel von Esculenten vom N. ischiaticus aus 250 mal maximal durch einen Induktionsschlag in gleichmäßigen Intervallen durch ein Uhrwerk gereizt. Die

[1]) Vgl. Pflüger, Das Glykogen. 2. Aufl. 1905, S. 424 ff.; ferner J. Seegen, Du Bois-Reymonds Arch. 1895, 242.

Muskeln hingen am Nerven in Ringerlösung und waren nur durch ihr eigenes Gewicht belastet. Durch die Ringerlösung wurde ein rascher Strom von Sauerstoff geleitet. In derselben Lösung lagen gleichzeitig die 8 linken Schenkel der gleichen Tiere. Nach 5 Stunden wurde gleichzeitig in den gereizten und den ungereizten Schenkeln der Glykogengehalt bestimmt. Es ergab sich in den ruhenden Schenkeln 0,702 $^0/_0$ Glykogen, in den gereizten 0,647 g Glykogen, d. h. eine Abnahme in den gereizten Schenkeln um 0,055 g oder 8 $^0/_0$. Da die verwendeten Schenkel 50 g wogen, so ergibt das einen Verbrauch von etwa 28 mg Glykogen für 250 Zuckungen. Dabei ist zu bedenken, daß der mögliche Fehler der Glykogenanalyse wohl auf 50 $^0/_0$ dieses Wertes anzusetzen ist. Entgegen den Behauptungen in der Literatur ist eine langdauernde Reizung also sehr wohl möglich, ohne daß das Glykogen wesentlich stärker abnimmt als es der mechanischen Arbeit und der vom Muskel abgegebenen Wärme entspricht, wenn eine vollständige Oxydation des Glykogens angenommen wird. Es ist beabsichtigt, eine größere Versuchsreihe im kommenden Winter nach dieser Richtung anzustellen, da ein einzelner Versuch ja natürlich nichts beweist.

Während die bisher mitgeteilten Versuche in völliger Übereinstimmung mit den seinerzeit in einer vorläufigen Mitteilung im Centralbl. f. Physiol. **26**, Nr. 7 veröffentlichten stehen, hat sich bezüglich der Froschovarien und Froscheier bei ausgedehnteren Versuchen ein wesentlich anderer Befund ergeben. Es hat sich nämlich gezeigt, daß bei Rana fusca die aus dem Ovidukt ausgedrückten reifen Eier in Leitungswasser und nach Zusatz von Hodenaufschwemmung nicht durch Anoxybiose beeinflußbar sind. Die oxybiotischen Eier enthielten im Mittel aus 3 Versuchen 0,9873 $^0/_0$ Glykogen, die anoxybiotischen 0,9713 $^0/_0$, also eine Abnahme von 0,016 g pro 100 g Ei oder 1,7 $^0/_0$. Diese Größe liegt in den Fehlergrenzen der Bestimmungsmethode. Ebenso verhielten sich die Ovarien von Esculenta. Es gelang leider in diesem Jahre nicht, natürlich befruchtete Eier von Esculenta zu erhalten, so daß die Frage, wie sich bei diesen die Beeinflussung durch Anoxybiose verhält, noch offen gelassen werden muß. Die Ovarien von Esculenten, die nach der Brunstzeit untersucht wurden, zeigten ein verschiedenes Verhalten, je nachdem sie in Ringerlösung oder in Leitungs-

wasser untersucht wurden. In Ringerlösung war das Glykogen stabil und durch Anoxybiose nicht beeinflußbar. In destilliertem Wasser war das Glykogen labil und in 3 von 5 Versuchen durch Anoxybiose sehr deutlich beeinflußbar. 2 Versuche indessen zeigten diese Beeinflussung durch Anoxybiose nicht. Es ist also hier ein abschließendes Urteil noch nicht möglich. Bisher ist im Gegensatz zu den beiden in der vorläufigen Mitteilung publizierten Versucheneine Beeinflussung der Glykogenhydrolyse durch Anoxybiose am Froschei und Ovarium nicht bewiesen. Ich werde diese Frage im nächsten Frühjahr von neuem untersuchen.

So ergeben die Verhältnisse im autonomen Organ im wesentlichen ähnliche Befunde wie die früher am lebenden

Tabelle I.
Glykogenschwund in autonomen Froschlebern in den Monaten November bis Februar.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Leber		Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber in g	Abnahme des Glykogens in °/₀ des Anfangsgehaltes
		ante	post		
29. XI. 12	esculenta 4h 22—23°	12,00	11,59	0,41	3,4
6. XII. 12	esculenta 4h 22—23°	9,71	9,70	0,01	0,1
10. XII. 12	esculenta 4h 22—23°	12,89	12,20	0,69	5,4
4. I. 13	fusca 4h 22—23°	14,84	14,61	0,23	1,6
18. XII. 12	esculenta 4h 22—23°	11,96	12,14	−0,18	−1,4
9. I. 13	esculenta[1] 4 1/2h 22—23°	10,76	10,30	0,46	4,3
9. I. 13	esculenta 5 1/2h 22—23°	10,99	10,65	0,34	3,3
6. II. 13	esculenta[2] 4h 24°	7,23	7,86	−0,63	−8,7
Mittelwert a)		11,297	11,131	0,166	1,5
ohne den Versuch vom 6. II. 13 und den Versuch vom 9. I. 13 b)		12,065	11,815	0,250	2,0

[1]) Die Tiere, die zu diesem Versuche dienten, waren vor der Präparation 4 1/4h bei 17° anoxybiotisch gemacht.
[2]) Der Versuch ist eingehend besprochen (diese Zeitschr. 52, 479), er wurde mit möglichst blutfrei gespülten Lebern angestellt.

Tiere angestellten Versuche. Eine sehr wesentliche Differenz ist aber vorhanden. Im Winter nämlich ist die Beeinflussung durch Anoxybiose am ganzen Tier sehr deutlich. Im autonomen Organ kann sie in dieser Jahreszeit nicht erhalten werden. Hier entsteht die wichtige Frage, wodurch diese Differenz bewirkt wird. Im autonomen Organ fehlt der Einfluß des Nervensystems und es fehlt die Zirkulation. Es fehlt ferner die Muskeltätigkeit. Es muß weiteren Versuchen vorbehalten bleiben, zu entscheiden, welcher dieser 3 Faktoren es ist, der die Differenz zwischen autonomem Organ und lebendem Tier verursacht. Diese Differenz besteht aber nur im Winter.

Tabelle II.

Glykogenschwund in autonomen Froschlebern in den Monaten März bis Juni.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Leber		Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber in g	Abnahme des Glykogens in $^0/_0$ des Anfangsgehaltes
		ante	post		
31. III. 13	fusca 4^h 12^0	2,48	2,08	0,40	16,1
2. IV. 13	esculenta 4^h 12^0	10,00	9,32	0,68	6,8
5. IV. 13	esculenta 3^h 22^0	7,87	6,71	1,16	14,7
22. IV. 13	esculenta 4^h 15′ 22^0	8,56	7,07	1,49	17,4
26. IV. 13	esculenta $3^1/_2{}^h$ 22^0	5,58	4,34	1,24	22,0
30. IV. 13	esculenta 4^h 22^0	4,33	2,99	1,34	30,9
20. V. 13	esculenta 4^h 22^0	2,68	1,69	0,99	37,0
21. V. 13	esculenta 3^h 15′ 22^0	2,20	1,22	0,98	44,5
8. VI. 13	esculenta [1]) 3^h 22^0	14,44	12,72	1,72	11,85
3. VI. 13	esculenta [1]) 3^h 22^0	7,48	6,33	1,15	15,4
4. VI. 13	esculenta [1]) 3^h 22^0	2,60	2,04	0,56	21,6
Mittelwert der bei 22^0 angestellten Versuche		6,193	5,012	1,181	19,1

[1]) Die Tiere waren 8 Tage lang bei einer konstanten Temperatur von 9 bis 10^0 gehalten worden, zum Teil mit Fleisch gefüttert und mit $10^0/_0$iger Traubenzuckerlösung injiziert worden.

Tabelle III.

Einfluß der Anoxybiose auf den Glykogenschwund in autonomen Lebern während der Monate November und Dezember.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Leber nach		Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber durch Anoxybiose in g	Abnahme des Glykogens in % des Anfangsgeh. durch Anoxybiose
		Oxybiose	Anoxybiose		
15. XI. 12	esculenta 2^h 22°	13,66	13,80	−0,14	−1,0
23. XI. 12	esculenta 4^h 22°	11,88	12,30	−0,42	−3,4
20. XI. 12	fusca 2^h 22°	12,48	12,48	0	0
6. XII. 12	fusca 4^h 22°	11,75	11,39	+0,36	3,0
11. XII. 12	esculenta 4^h 22°	12,57	12,10	+0,47	3,7
17. III. 13	esculenta 4^h 15′ 22°	8,84	8,66	+0,18	2,0
	Mittelwert	11,863	11,789	0,074	0,63

Tabelle IV.

Einfluß der Anoxybiose auf den Glykogenschwund in autonomen Lebern von R. fusca im Februar und März.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Leber nach		Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber durch Anoxybiose in g	Abnahme des Glykogens in % der oxyb. Leber durch Anoxybiose
		Oxybiose	Anoxybiose		
28. II. 13	fusca 4^h 15′ 22°	5,93	5,23	0,70	11,8
13. III. 13	fusca $4^1/_2{}^h$ 22°	4,92	4,48	0,44	8,9
20. III. 13	fusca 4^h 15′ 22°	2,42	2,22	0,20	8,3
26. III. 13	fusca $2^1/_4{}^h$ 22°	2,62	2,42	0,20	7,6
27. III. 13	fusca 4^h 22°	1,81	1,74	0,07	3,8
31. III. 13	fusca 4^h 12°	2,08	1,96	0,12	5,8
	Mittelwert	3,297	3,008	0,289	8,77

Tabelle V.

Einfluß der Anoxybiose auf den Glykogenschwund in autonomen Lebern von R. esculenta im April und Mai.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Leber nach		Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber durch Anoxybiose in g	Abnahme des Glykogens durch Anoxybiose in % der oxyb. Leber
		Oxybiose	Anoxybiose		
5. IV. 13	esculenta 3^h 22^0	6,71	6,33	0,38	5,7
22. IV. 13	esculenta $4^h 15'$ 22^0	7,07	6,69	0,38	5,4
26. IV. 13	esculenta $3^1/_2{}^h$ 22^0	4,34	3,72	0,62	14,9
30. IV. 13	esculenta 4^h 22^0	2,99	2,88	0,11	3,7
20. V. 13	esculenta 4^h 22^0	1,69	1,56	0,13	7,7
21. V. 13	esculenta $3^h 15'$ 22^0	1,22	1,09	0,13	10,7
	Mittelwert	4,003	3,712	0,291	7,2

Tabelle VI.

Einfluß der Anoxybiose in autonomen Lebern im Oktober.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Leber nach		Abnahme des Glykogens pro 100 g Leber durch Anoxybiose in g	Abnahme in % des oxybiot. Glykogens
		Oxybiose	Anoxybiose		
8. X. 12	esculenta $2^1/_2{}^h$ 22^0	15,99	14,58	1,41	9,0
10. X. 12	esculenta 4^h 22^0	13,53	12,77	0,76	5,6
20. X. 12	fusca 5^h 22^0	12,30	11,90	0,40	3,3
30. X. 12	esculenta 3^h 22^0	16,64	15,77	0,87	5,2
	Mittelwert	14,615	13,755	0,86	5,9

Tabelle VII.

Glykogenschwund in autonomen Muskeln im Winter und im Sommer.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Organ		Abnahme d. Glykogens pro 100 g Organ g	Abnahme des Glykogens in °/₀ des Anfangsgehaltes	Bemerkungen
		ante	post			
29. XI. 12	fusca 4ʰ 22°	1,238	1,238	0	0	Gastroknem.
5. XII. 12	fusca 4ʰ 22°	1,092	1,076	0,016	1,5	"
10. XII. 12	esculenta 4½ʰ 2°	0,790	0,749	0,041	5,3	"
4. I. 12	esculenta 4ʰ 22°	1,304	1,275	0,029	2,6	"
7. III. 13	fusca 4ʰ 22°	1,181	1,173	0,008	0,7	"
	Mittelwert	1,121	1,102	0,0188	1,6	
10. IV. 12	esculenta 2½ʰ 24°	0,438	0,369	0,069	16,0	Schenkel
7. V. 12	esculenta 3ʰ 24°	0,440	0,376	0,064	14,6	"
7. V. 13	esculenta 4ʰ 22°	0,351	0,258	0,093	26,5	"
1. VI. 12	esculenta 3ʰ 25°	0,181	0,146	0,035	19,4	Gastroknem.
	Mittelwert	0,3525	0,2875	0,065	18,5	

Tabelle VIII.

Beeinflussung des Glykogenschwunds durch Anoxybiose in autonomen Muskeln im Winter und im Frühjahr.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Organ nach		Abnahme durch Anoxybiose absolut in g	Abnahme durch Anoxybiose in °/₀ des oxyb. Glykogengeh.	Bemerkungen
		Oxybiose	Anoxybiose			
15. XI. 12	esculenta 2ʰ 22°	0,507	0,504	0,003	0,6	Gastroknem.
20. XI. 12	fusca 2ʰ 22°	1,207	1,211	— 0,004	0,3	"
23. XI. 12	fusca + escul. 4ʰ 22°	1,058	1,061	— 0,003	0,3	"
11. XII. 12	esculenta 4ʰ 22°	0,675	0,645	0,030	4,4	"
Mittelwert d. November- u. Dezemberversuche		0,8618	0,8553	0,0065	0,7	

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Organ nach		Abnahme durch Anoxybiose absolut in g	Abnahme durch Anoxybiose in °/₀ des oxyb. Glykogengeh.	Bemerkungen
		Oxybiose	Anoxybiose			
18. III. 13	fusca $4^1/_4$ h 24°	0,959	0,876	0,083	8,6	Gastroknem.
20. III. 13	fusca $4^1/_2$ h 22°	0,767	0,657	0,110	14,3	„
26. III. 13	fusca $2^1/_4$ h 24°	0,997	1,014	— 0,017	— 1,7	„
27. III. 13	fusca 4 h 24°	0,969	0,886	0,083	8,5	„
31. III. 13	fusca 4 h 12°	0,837	0,765	0,072	8,6	„
Mittelwert der Märzversuche an R. fusca .		0,9058	0,8396	0,0662	7,3	

Tabelle IX.

Einfluß der Anoxybiose auf den Glykogenschwund in autonomen Muskeln.

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Organ nach		Abnahme durch Anoxybiose absolut in g	Abnahme in °/₀ des oxybiot. Glykogengehaltes	Bemerkungen
		Oxybiose	Anoxybiose			
17. III. 13	esculenta $4^1/_4$ h 22°	0,644	0,600	0,044	7,0	Gastroknem.
2. IV. 13	esculenta 4 h 12°	0,623	0,601	0,021	3,4	„
5. V. 13	esculenta 3 h 23°	0,350	0,336	0,014	4,0	Schenkel
21. IV. 13	esculenta 4 h 22°	0,447	0,394	0,053	11,8	„
22. IV. 13	esculenta $4^1/_4$ h 22°	0,488	0,397	0,097	18,6	Gastroknem.
26. IV. 13	esculenta $3^1/_2$ h 22°	0,447	0,342	0,105	23,5	„
30. IV. 13	esculenta 4 h 22°	0,445	0,341	0,104	23,3	„
18. V. 12	esculenta 3 h 24°	0,227	0,166	0,061	27,0	„
20. V. 13	esculenta 4 h 22°	0,289	0,218	0,071	25,0	„
21. V. 13	esculenta $3^1/_4$ h 22°	0,284	0,221	0,063	22,0	„
14. VI. 12	esculenta 4 h 19°	0,173	0,122	0,051	30,0	„
Mittelwert der Sommerversuche an esculenta		0,4015	0,3398	0,0617	15,0	

Tabelle IX (Fortsetzung).

Datum	Tierart, Dauer und Temperatur	Glykogengehalt in 100 g Organ nach		Abnahme durch Anoxybiose absolut in g	Abnahme in °/₀ des oxybiot. Glykogengehaltes	Bemerkungen
		Oxybiose	Anoxybiose			
16. IX. 12	esculenta 3h 22°	0,663	0,593	0,070	10,6	Gastroknem.
18. IX. 12	esculenta 3h 20°	0,737	0,561	0,176	24,0	"
21. IX. 12	esculenta 3h 20°	0,443	0,398	0,045	10,0	Schenkel
24. IX. 12	esculenta 4h 22°	0,423	0,388	0,035	8,3	"
Mittelwert d. Septemberversuche an esculenta		0,5665	0,4850	0,0815	14,0	

Über eine Fehlerquelle bei Blutzuckerbestimmungen in Frosch- und Schildkrötenblut.

Von

Ernst J. Lesser.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 13. Juli 1913.)

I. Bang ist es mit Hilfe seiner Mikromethode gelungen, im Froschblute reduzierende Substanz nachzuweisen[1]). Er fand bei Sommerfröschen einen Blutzuckergehalt von 0,04 %. Ich hatte mich (ebenso wie Nishi im Schildkrötenblut) bei Verwendung ausreichender Blutmengen vergeblich bemüht, im nach Rona-Michaelis enteiweißten Blute reduzierende Substanz nachzuweisen[2]). Wohl aber gelang dies im Blute von Fröschen, die vorher anoxybiotisch gemacht waren. Es schien von Interesse zu untersuchen, wie die Differenz in Bangs und meinen Versuchen zustande kommt. Ich habe zunächst meine früheren Bestimmungen mit größeren Blutmengen wiederholt. Niemals gelang es, im enteiweißten, auf 20 ccm bei schwachsaurer Reaktion eingeengten Blutfiltrat reduzierende Substanz nach Bertrand nachzuweisen. Es ließ sich niemals auch nur spurenweise eine Abscheidung von Kupferoxydul nachweisen. Wurde das Asbestfilter mit der Bertrandschen Eisenlösung behandelt, so erhielt man stets nach Zusatz von höchstens 3 Tropfen $^1/_{10}$-Permanganatlösung im Filtrat deutliche Rotfärbung.

Eine Übersicht über diese Versuche gibt Tabelle I.

---

[1]) Diese Zeitschr. **49**, 40.

[2]) E. J. Lesser, Zeitschr. f. Biol. **60**, 396. — Nishi, Schmiedebergs Arch. **62**, 170, 1910.

Tabelle I.

Datum 1913	Zahl der Frösche	Verarbeitetes Blutgewicht g	Dem Filtrat entsprechendes Blutgewicht g	Nach Bertrand gefundenes Cu mg	Traubenzucker, der nach Bang hätte gefunden werden sollen mg	Bemerkungen
9. VI.	16	18,3	11,2	0	4,5	Während der Präparation der Herzen und der Blutentnahme steht das Wägegläschen mit Kaliumoxalat in Eis.
10. „	16	26,0	19,8	1 ?	7,9	
11. „	14	18,3	15,6	0	6,2	
12. „	30	25,0	20,0	0	8,0	
17. „	20	18,4	16,3	0	6,5	

Das Blut wurde wie früher aus dem Herzen entnommen. Es tropfte aus der Wunde direkt in ein mit Kaliumoxalat beschicktes, gewogenes Wägegläschen, das während der Präparation in Eis stand. Die Präparation dauerte $^1/_2$ bis $^5/_4$ Stunden.

In den Versuchen am 11., 12. und 17. Juni habe ich dem Blute genau bekannte Traubenzuckermengen zugesetzt. Am 11. VI. wurden auf 18,3 g Blut 10,1 mg Traubenzucker zugesetzt. In 15,6 g hätten 8,6 mg wiedergefunden werden sollen. Ich erhielt aber nur 5 mg zurück. Am 12. Juni wurden auf 25 g Blut 13,9 mg Traubenzucker zugesetzt. In 20 g Blut hätten 11,1 mg Traubenzucker gefunden werden sollen. Ich erhielt aber nur etwa 5 mg Zucker zurück.

Es war daran zu denken, daß beim Eindampfen Traubenzucker zerstört wird, oder daß trotz der Eiskühlung durch Glykolyse während der Präparation Zucker verschwindet. Kontrollversuche, bei denen 5 mg Traubenzucker in 350 ccm Wasser gelöst bei Gegenwart von Phosphatgemisch auf dem Wasserbade auf 10 ccm eingeengt wurden, ergaben aber, daß hierbei keine Verluste auftraten. Es wurden daher am 17. Juni 18,7 mg Traubenzucker dem Blutfiltrat erst nach dem Einengen auf dem Wasserbade direkt vor Anstellung der Bertrandschen Bestimmung zugesetzt. Bei der Analyse wurden aber nur 8 mg Traubenzucker zurückerhalten. Das gleiche ergab ein nach der Alkoholmethode von **Bang** behandeltes Schildkrötenblut (12 g Blut Testudo graeca). Dem eiweißfreien Filtrat war nach dem Einengen und nach Behandlung des eingeengten Filtrats mit kolloidalem Eisen direkt vor Ausführung der Zuckerbestimmung

18,7 mg Traubenzucker zugesetzt worden. Nur 13 mg wurden wiedergefunden.

Daraus ergibt sich, daß in Frosch- und Schildkrötenblut Substanzen enthalten sind, die bei Enteiweißung durch kolloidales Eisen ins Filtrat gehen und eine gewisse Menge Kupferoxydul in Lösung halten. Es ist also nötig, vor der Anstellung der Bertrandschen Zuckerbestimmung das Blutfiltrat von diesen Stoffen zu befreien. Zu diesem Zweck habe ich das eingeengte Blutfiltrat mit Mercurinitrat wie bei der Harnstoffällung behandelt[1]). Doch wurde ein deutlicher Überschuß von Mercurinitrat zugesetzt. Bei fast neutraler Reaktion wurde filtriert (2 mal durch dasselbe Filter), der Niederschlag ausgewaschen. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit und Filtrat und Waschwasser auf dem Wasserbade eingeengt. Nach Vertreibung des Schwefelwasserstoffs wurde Natriumacetat zugegeben und im Wasserbad auf etwa 30 ccm eingeengt. In diesen wurde die Zuckerbestimmung nach Bertrand ausgeführt.

In auf diese Weise gereinigten Blutfiltraten von Fröschen ließ sich im Juli stets reduzierende Substanz nachweisen, und zwar ergab sich im Mittel ein Blutzuckergehalt von 0,035 %, also eine Zahl, die der von Bang mit der Mikromethode gefundenen sehr nahe liegt. Im ganzen wurden bisher 3 Versuche angestellt. Am 4. Juli wurde von 10 Esculenten 24,65 g Blut erhalten. Das Filtrat entsprach 19,97 g Blut. Nach dem Einengen auf etwa 80 ccm, aber vor der Fällung mit Mercurinitrat, wurden 18,5 mg Traubenzucker zugesetzt. Bei der Bertrandschen Bestimmung wurden 26,8 mg Traubenzucker gefunden. Mithin waren in 19,97 g Blut 8,1 mg Traubenzucker oder 0,04 % enthalten.

Am 5. Juli wurde von 13 Tieren der gleichen Froschlieferung 31,83 g Blut gewonnen. Das mit Mercurinitrat gereinigte Blutfiltrat entsprach 26,93 g Blut und ergab 19,6 mg Kupfer nach Bertrand, also etwa 9,6 mg Traubenzucker, entsprechend 0,036 %.

---

[1]) C. Neuberg hat zu diesem Zwecke Mercuriacetat empfohlen. Er hat das gleiche Verhalten im Harn beobachtet, bei einem Zuckergehalt von 0,1 %. Siehe diese Zeitschr. 24, 430, 1910; 48, 505, 1912; ferner C. Neuberg, Der Harn. Handbuch 1911, 328, 311.

Am 8. Juli wurde, um jeden Zweifel auszuschließen, in der gleichen Menge des gleichen Blutfiltrats einmal ohne vorherige Reinigung, einmal nach Behandlung mit Mercurinitrat die Bertrandsche Bestimmung ausgeführt. Verwendet wurden 27 Tiere der gleichen Lieferung, die in der Zwischenzeit bei Zimmertemperatur ohne Nahrungszufuhr gehalten waren. Von 27 Tieren wurden 44,15 g Blut erhalten. Das Filtrat entsprach 36,8 g Blut. Es wurde eingeengt und auf genau 200 ccm aufgefüllt. 100 ccm davon wurden nach Bertrand behandelt, nachdem sie auf etwa 30 ccm eingeengt waren. Sie ergaben keine Spur Reduktion. 100 ccm wurden in der oben angeführten Weise mit Mercurinitrat ausgefällt, das letzte Filtrat auf 30 ccm konzentriert. Sie ergaben nach Bertrand 11,4 mg Kupfer oder etwa 5,6 mg Traubenzucker in 19,4 g Blut, entsprechend 0,029 $^0/_0$ Blutzucker.

Ob die Reinigung mit Mercurinitrat ausreicht, um alle störenden Stoffe zu beseitigen, kann nur durch Versuche entschieden werden, bei denen gleichzeitig polarisiert wird. Ein zu diesem Zweck von Michaelis und Rona angegebenes Polarisationsrohr stand mir bisher nicht zur Verfügung.

Meine früheren Angaben sind also zu berichtigen entsprechend den Befunden von Bang, dem es mit seiner Mikromethode zuerst gelungen ist, den Gehalt des Froschblutes an reduzierender Substanz zu bestimmen. Entfernt man die störenden Substanzen, die Kupferoxydul in Lösung erhalten können, so ist auch mit der Bertrandschen Methode im Froschblute reduzierende Substanz nachweisbar.

Seinerzeit waren die Blutzuckerbestimmungen beim Frosch ausgeführt worden, um zu untersuchen, wie sich der Blutzucker bei Anoxybiose ändert. Trotz der damals mir noch nicht bekannten Fehlerquelle bleiben die damals erhobenen Befunde bestehen, daß der Blutzucker durch Anoxybiose eine deutliche Vermehrung aufweisen kann, die, mit dem gleichzeitigen anoxybiotischen Glykogenschwund verglichen, nur gering ist.

Über die Umwandlung des Asparagins beim Kochen in wässeriger Lösung.

Von

Felix Ehrlich und Fritz Lange.

(Aus dem Landwirtschaftlich-technologischen Institut der Kgl. Universität Breslau.)

(Eingegangen am 18. Juli 1913.)

Es ist eine durch unzählige experimentelle Untersuchungen gestützte Tatsache, daß organische Substanzen, deren Molekül asymmetrisch gebaut ist, in der Natur nur in einer optischen Modifikation vorkommen.

Zu den wenigen Ausnahmen dieser scheinbar allgemein gültigen Regel gehört das Asparagin, das gewöhnlich in den Pflanzen als l-Asparagin vorkommt, in einem Falle aber auch in Form des d-Asparagins neben l-Asparagin aus Wickenkeimen isoliert werden konnte.

Dieses zuerst von Piutti[1]) aufgezeigte klassische Beispiel des natürlichen Vorkommens von beiden Stereoisomeren einer Verbindung ist neuerdings in seinen Resultaten in einer Arbeit von H. Pringsheim[2]) angezweifelt worden. Pringsheim glaubt nämlich aus einer Reihe von Versuchen folgern zu müssen, daß das d-Asparagin Piuttis ursprünglich nicht als solches in den Pflanzen vorhanden war, sondern erst während der Darstellung sich beim Eindampfen der wässerigen Lösung aus dem natürlichen Asparagin infolge von Racemisierung gebildet hat und bei der dann folgenden fraktionierten Krystallisation abgeschieden worden ist. Daß eine Isolierung des Antipoden in diesem Falle möglich war, erklärt Pringsheim mit der Annahme, daß das d-Asparagin ein größeres Löslichkeitsvermögen

[1]) A. Piutti, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **19**, 1691, 1886.

[2]) H. Pringsheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 89, 1910.

in Wasser besitzt und sich deshalb in den Mutterlaugen merkbar anreichert.

Der Widerspruch dieser Annahme mit der allgemein vorherrschenden Auffassung, daß die beiden Antipoden einer asymmetrisch gebauten Verbindung, von der Richtung des Drehungsvermögens abgesehen, vollkommen gleiche physikalische Konstanten, also auch gleiche Löslichkeit zeigen, veranlaßte uns schon vor längerer Zeit zu einer Nachprüfung der Pringsheimschen Versuche, besonders in der Richtung, ob nicht etwa doch mit einem natürlichen Vorkommen des d-Asparagins zu rechnen ist, und ob vielleicht die von Pringsheim gemachten Beobachtungen eine andere Erklärung zulassen. Diese Vermutung schien wenigstens bis zu einem gewissen Grade gestützt durch die Untersuchungen des einen[1]) von uns über das Verhalten von Hefe gegen racemische Asparaginsäure. Es zeigte sich nämlich, daß im Gegensatz zu vielen andern Aminosäuren[2]) die beiden Komponenten der racemischen Asparaginsäure vom Hefepilz vollkommen gleichmäßig angegriffen werden, so daß die nach der Vergärung erhaltenen Produkte stets inaktiv waren. Diese Beobachtung schien ihre plausible Erklärung zu finden, wenn man, ausgehend von dem Befunde Piuttis, die Annahme aufrecht erhielt, daß die Asparaginsäure bzw. ihr Amid in den Naturprodukten in beiden optischen Modifikationen vorhanden sein kann, wodurch die Gewöhnung der Hefezelle sowohl an die rechts- wie an die linksdrehende Form dieser Verbindungen und die gleichzeitige Assimilation derselben leicht verständlich wäre.

Zur Klärung dieser Fragen schien es uns nun wünschenswert, eine Reihe von Versuchen anzustellen, einmal in der Richtung, ob man nicht etwa doch aus Pflanzensäften mittels einer möglichst schonenden Darstellungsmethode direkt d-Asparagin isolieren kann, und andererseits zu untersuchen, welche Veränderungen das Asparagin beim Kochen seiner wässerigen Lösung erleidet. Wir beabsichtigten, die Resultate dieser Versuche, die sich bereits über einen Zeitraum von $1^1/_2$ Jahren erstrecken und noch nicht zum Abschluß gekommen sind, späterhin im Zusammenhang zu veröffentlichen. Indes veranlassen uns die

[1]) F. Ehrlich. Die Arbeit wird demnächst veröffentlicht.

[2]) F. Ehrlich, diese Zeitschr. 1, 8, 1906; 8, 438, 1908.

interessanten Mitteilungen, die E. Erlenmeyer[1]) neuerdings über das Asparagin gemacht hat, und bei denen er teilweise zu ähnlichen Resultaten wie wir gekommen ist, unser Tatsachenmaterial in den Hauptzügen schon jetzt zu publizieren, da dasselbe vielleicht irgendwie zur Klarlegung mancher der zur Diskussion stehenden Fragen beitragen kann, und um uns die Möglichkeit der weiteren Bearbeitung dieses Gebietes in der von uns eingeschlagenen Richtung zu sichern.

Untersuchung von Asparaginsäurepräparaten verschiedener Herkunft auf ihre Eigenschaften und ihren Gehalt an d-Asparagin.

In der Literatur finden sich Beschreibungen der Eigenschaften des natürlichen Asparagins hauptsächlich in den Arbeiten von Pasteur[2]), Champion und Pellet[3]), Piutti[4]) und Becker[5]), die zeitlich weit zurückliegen und in ihren Ergebnissen zum Teil große Differenzen hinsichtlich des spezifischen Drehungsvermögens aufweisen. Diese Unterschiede im Drehungsvermögen erklären sich wohl zum Teil dadurch, daß die Drehungsbestimmungen des Asparagins, das eine sehr wechselnde spezifische Drehung besitzt und in wässeriger Lösung schwach, in salzsaurer dagegen stärker dreht, in sehr verschiedenen Konzentrationen der Lösungen, namentlich in Hinsicht auf den Salzsäuregehalt, ausgeführt wurden, zum Teil scheint aber auch an diesen Abweichungen die verschiedene Herkunft der Präparate schuld gewesen zu sein. Da nun aber die Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens des Asparagins in salzsaurer Lösung ein sehr geeignetes Mittel zur genauen Identifizierung und Charakterisierung dieser Substanz gewährt, und da in neuerer Zeit außer den Pringsheimschen Untersuchungen keine weiteren Angaben hierüber vorliegen, so schien es uns keineswegs überflüssig, vor Anstellung weiterer Versuche zu-

---

[1]) E. Erlenmeyer, diese Zeitschr. **52**, 439, 1913.

[2]) Pasteur, Ann. chim. phys. **31**, 75, 1851.

[3]) Champion und Pellet, Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. 82, 819, 1876.

[4]) A. Piutti, Gaz. chim. ital. **27**, 182, 1887.

[5]) Becker, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **14**, 1031, 1881.

nächst einmal das genaue spezifische Drehungsvermögen und gleichzeitig die Zusammensetzung von Asparaginpräparaten verschiedener Herkunft festzustellen. Besonders wünschenswert war es, die Eigenschaften der im Handel befindlichen Präparate im Vergleich mit einem Asparagin zu untersuchen, das mit möglichster Schonung der Substanz aus Wicken hergestellt wurde. Es war auch sehr wahrscheinlich, daß sich bei derartigen Untersuchungen ein Gehalt an d-Asparagin allein schon aus dem niedrigeren Drehungsvermögen der Substanz erkennen lassen mußte.

Asparagin Kahlbaum.

Zur Untersuchung gelangten zunächst zwei Präparate, bei denen die Drehung direkt und nach dem Umkrystallisieren festgestellt wurde. Wir haben hierfür die Anwendung der 10 vol.-$^0/_0$ igen Salzsäure nach dem Beispiel von Champion und Pellet und H. Pringsheim bevorzugt, da in diesen Lösungen das Asparagin die maximale Drehung von $[\alpha]_D^{20} = +37,27^0$ aufweist. Es wird also bei dieser Methode eine relativ größere Genauigkeit erzielt, als wenn man nach Becker nur 1 Mol. Salzsäure zu Asparaginlösungen gibt, wobei die Drehung nur auf $[\alpha]_D^{20} = +26,4^0$ erhöht wird.

Ein aus früheren Jahren stammendes Kahlbaumsches Präparat gab bei der Analyse nach dem Trocknen über Schwefelsäure:

0,1371 g Substanz: 22,2 ccm N (21^0, 744 mm).
Für $C_4H_8O_3N_2 + H_2O$: Ber.: N 18,66,
Gef.: N 18,39.

Die spezifische Drehung in 10 vol.-$^0/_0$ iger Salzsäure zeigte folgende Werte:

0,9277 g Substanz = 0,8164 g wasserfreie Substanz gelöst in 10 vol.-$^0/_0$ iger Salzsäure. Prozentgehalt der Lösung: 8,01. Spezifisches Gewicht bei 20^0: 1,0736. Drehung im 2-dcm-Rohr: $+5,38^0$ bei 20^0.

$[\alpha]_D^{20} = +31,28^0$ (bezogen auf wasserfreie Substanz).

Das Präparat zeigte also eine niedrigere Drehung als die von Champion und Pellet angegebene. Auch beim Umkrystallisieren der Substanz aus Wasser ließen sich nur Fraktionen fast gleicher Zusammensetzung und Drehung abscheiden.

1. Fraktion.

0,1549 g Substanz: 25,4 ccm N (21°, 744 mm).

Für $C_4H_8O_3N_2 + H_2O$: Ber.: N 18,66,
Gef.: N 18,64.

0,9117 g Substanz = 0,8023 g wasserfreie Substanz gelöst in 10vol.-%iger Salzsäure. Prozentgehalt: 7,65. Spezifisches Gewicht bei 20°: 1,0737. Drehung im 2-dcm-Rohr: + 5,24° bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = +31,90°.$$

2. Fraktion.

0,9002 g Substanz = 0,7922 g wasserfreie Substanz gelöst in 10vol.-%iger Salzsäure. Prozentgehalt: 7,56. Spezifisches Gewicht bei 20°: 1,0735. Drehung im 2-dcm-Rohr: + 5,07 bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = +31,24°.$$

Ein Kahlbaumsches Präparat aus dem Jahre 1911 ergab, direkt untersucht, folgende Werte.

0,1518 g Substanz: 25,1 ccm N (19°, 738 mm).

0,1771 g Substanz: 0,2087 g CO_2, 0,1080 g H_2O.

Für $C_4H_8O_3N_2 + H_2O$: Ber.: N 18,66, C 32,00, H 6,66;
Gef.: N 18,77, C 32,14, H 6,82.

0,9146 g Substanz = 0,8049 g wasserfreie Substanz gelöst in 10vol.-%iger Salzsäure. Prozentgehalt: 7,05. Dichte bei 20°: 1,0732. Drehung im 2-dcm-Rohr: + 5,24°.

$$[\alpha]_D^{20} = +34,63°.$$

Eine Portion dieser Substanz wurde aus Wasser umkrystallisiert und lieferte 3 Fraktionen, die einzeln untersucht wurden.

1. Fraktion. 23,9 g.

0,1518 g Substanz: 24,9 ccm N (24°, 752 mm). — 0,1581 g Substanz: 25,6 ccm N (20°, 747 mm).

0,1808 g Substanz: 0,2108 g CO_2, 0,1031 g H_2O. — 0,1798 g Substanz: 0,2102 g CO_2, 0,1074 g H_2O.

Für $C_4H_8O_3N_2 + H_2O$:
Ber.: N 18,66; C 32,00; H 6,66;
Gef.: N 18,65, 18,54; C 31,80, 31,89; H 6,38, 6,68.

0,9159 g Substanz = 0,8060 g Substanz gelöst in 10vol.-$^0/_0$iger Salzsäure. Prozentgehalt: 7,08. Dichte bei 20°: 1,0735. Drehung im 2-dcm-Rohr: + 5,24° bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = +34{,}47^0.$$

0,9128 g Substanz = 0,8033 g wasserfreie Substanz in 10vol.-$^0/_0$iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt: 7,05. Dichte bei 20°: 1,0732. Drehung: + 5,24° bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = +34{,}63^0.$$

2. **Fraktion.** 2,2 g.

0,1725 g Substanz: 27,5 ccm N (19°, 752 mm).
0,1800 g Substanz: 0,2101 g CO_2, 0,1101 g H_2O.
$C_4H_8O_3N_2 + H_2O$: Ber.: N 18,66, C 32,00, H 6,66.
Gef.: N 18,44, C 31,83, H 6,84.

0,9288 g Substanz = 0,8174 g wasserfreie Substanz in 10vol.-$^0/_0$iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt der Lösung: 7,16. Spezifisches Gewicht bei 20: 1,0737. Drehung im 2-dcm-Rohr: + 5,20° bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = +33{,}82^0.$$

3. **Fraktion.** 0,65 g.

0,6318 g Substanz = 0,5560 g wasserfreie Substanz in 10vol.-$^0/_0$iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt: 6,92. Dichte bei 20°: 1,7029. Drehung im 1-dcm-Rohr: + 2,36°.

$$[\alpha]_D^{20} = +31{,}78^0.$$

Es zeigte sich also, daß das neuere Kahlbaumsche Präparat ein um ca. 3° höheres Drehungsvermögen aufwies als das früher bezogene, doch erreicht auch ersteres nicht die von Champion und Pellet ($[\alpha]_D^{20} = +37{,}27^0$) und H. Pringsheim ($[\alpha]_D^{20} = +36{,}19$) beobachte Maximaldrehung. Das Umkrystallisieren schien auf die Hauptmenge der Substanz keinen wesentlichen Einfluß auszuüben, da der größte Teil derselben mit unverändertem Drehungsvermögen zurückgewonnen wurde. Allerdings wurden in den letzten Versuchen stets leichter lösliche Fraktionen mit etwas geringerem Drehungsvermögen isoliert, deren Menge und Drehungsgröße je nach der Art des Umkrystallisierens schwankte, wie der folgende genau aufge-

arbeitete, an dem zuletzt untersuchten Kahlbaumpräparat angestellte Versuch besonders deutlich zeigt.

Es wurden 10 g Asparagin aus 50 ccm Wasser vorsichtig umkrystallisiert und in 3 Fraktionen zerlegt, die auf ihr Drehungsvermögen untersucht wurden.

1. Fraktion. 9,10 g.

0,5666 g Substanz = 0,4986 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-%iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt der Lösung: 7,29. Dichte bei 20°: 1,0741. Drehung im 1-dcm-Rohr: + 2,71° bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = + 34,61°.$$

2. Fraktion. 0,75 g.

0,5113 g Substanz = 0,4500 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-%iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt der Lösung: 7,78, Dichte bei 20°: 1,0762. Drehung im 1-dcm-Rohr: + 2,85° bei 20°.

$$[\alpha]_D^{20} = + 34,04°.$$

3. Fraktion. 0,12 g.

0,1065 g Substanz = 0,0937 g wasserfreie Substanz in 4 ccm Wasser gelöst. Konzentration der Lösung: 2,34 %. Drehung bei 20° im 1-dcm-Rohr: — 0,14°.

$$[\alpha]_D^{20} = - 5,98°.$$

0,10 g Substanz = 0,088 g wasserfreie Substanz in 3 ccm 10 vol.-%iger Salzsäure gelöst. Konzentration: 2,93 %. Drehung bei 20° im 1-dcm-Rohr: + 0,90°.

$$[\alpha]_D^{20} = - 30,71°.$$

Schließlich haben wir noch ein Asparagin untersucht, das wir uns selbst aus Wicken unter allen Vorsichtsmaßregeln, die zur Erhaltung der Eigenschaften der ursprünglichen Substanz dienen konnten, hergestellt haben.

Zu diesem Zweck wurden 500 g Samen von Vicia sativa auf feuchten Flußsand ausgesetzt und unter häufiger Besprengung mit Wasser im Dunkeln keimen gelassen. Nach 4 wöchentlichem Wachstum wurden die erhaltenen Keimlinge, deren Frischgewicht 2,7 kg betrug, in einem großen Mörser

unter Zusatz von etwas Seesand und wenig Wasser kräftig zerrieben und der entstandene Brei durch ein Koliertuch scharf abgepreßt, von neuem mit Wasser verrieben und nochmals koliert. Die vereinigten trüben Filtrate versetzten wir zur Ausfällung der Eiweißstoffe usw. mit kolloidaler Eisenlösung und dampften dann die vollkommen klar filtrierte Flüssigkeit sofort im Vakuum bei 40 bis 45° ein. Aus dem zurückbleibenden dunkelbraunen Sirup schieden sich beim Abkühlen die typischen Asparaginkrystalle ab, die abgesaugt und mit wenig Wasser gewaschen wurden. Das gelblich gefärbte Rohprodukt wog 11,9 g (I). Beim weiteren Einengen wurde noch eine zweite Krystallisation von 1,1 g (II) erhalten.

Die beiden getrennt abgeschiedenen Rohprodukte wurden jedes für sich aus heißem Wasser unter Zusatz von Kohle sehr vorsichtig umkrystallisiert und dabei in folgende Fraktionen zerlegt:

Zerlegung des Rohproduktes I. (11,9 g.)

1. Fraktion . . .	8,29 g	Asparagin
2. „ . . .	1,84 g	„
3. „ . . .	0,75 g	„
4. „ . . .	0,34 g	„
5. „ . . .	0,33 g	Sirup
	11,55 g	

1. Fraktion.

0,9160 g Substanz = 0,8061 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-%iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt 7,08. Dichte bei 20° 1,0697. Drehung im 1-dcm-Rohr bei 20° + 2,67°.

$$[\alpha]_D^{20} = +35,25^\circ.$$

0,1143 g Substanz über Schwefelsäure getrocknet. 0,1350 g CO_2, 0,0702 g H_2O; 0,1256 g Substanz: 20,7 ccm N (22°, 750 mm).

Für $C_4H_8O_3N_2 + 1\,H_2O$ Ber.: C 32,00; H 6,67; N 18,67.
Gef.: C 32,21; H 6,87; N 18,82.

2. Fraktion.

0,3022 g Substanz = 0,2659 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-%iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt 4,04. Dichte bei 20° 1,059. Drehung im 1-dcm-Rohr bei 20° + 1,56°.

$$[\alpha]_D^{20} = +36,46^\circ.$$

3. Fraktion.

0,3024 g Substanz = 0,2661 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-$^0/_0$iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt 3,98. Dichte bei 20° 1,059. Drehung im 1-dcm-Rohr bei 20° + 1,49°.

$$[\alpha]_D^{20} = + 35,35^0.$$

4. Fraktion.

0,2033 g Substanz = 0,1789 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-$^0/_0$iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt 2,57. Dichte bei 20° 1,0552. Drehung im 1-dcm-Rohr bei 20° + 0,97°.

$$[\alpha]_D^{20} = + 35,77^0.$$

Zerlegung des Rohproduktes II. (1,1 g.)

1. Fraktion	. . 0,77 g	Asparagin
2. „	. . 0,24 g	„ nicht ganz rein
3. „	. . 0,07 g	Sirup mit Krystallen, nicht untersucht.

1. Fraktion.

0,3003 g Substanz = 0,2643 g wasserfreie Substanz in 10 vol.-$^0/_0$iger Salzsäure gelöst. Prozentgehalt 3,96. Dichte bei 20° 1,059. Drehung im 1-dcm-Rohr bei 20° + 1,49°.

$$[\alpha]_D^{20} = + 35,53^0.$$

Die Untersuchungen ergaben also das immerhin bemerkenswerte Resultat, daß unser aus Wicken direkt gewonnenes Asparagin, das unter Vermeidung höherer Temperaturgrade isoliert war, in allen seinen Fraktionen ein merklich höheres Drehungsvermögen als die Handelspräparate zeigte, das in einer Fraktion ($[\alpha]_D^{20} = + 36,46^0$) nur noch um 0,81° niedriger war als der von Champion und Pellet beobachtete Maximalwert. Auch ist es auffallend, daß im Gegensatz zu den Kahlbaumschen Präparaten die Schwankungen im Drehungsvermögen der einzelnen Fraktionen unseres Wickenasparagins im allgemeinen geringer waren.

Ob die in einzelnen Fraktionen beobachteten niedrigeren Drehungswerte wirklich auf einen Gehalt von d-Asparagin in der natürlichen Substanz zurückzuführen sind, oder ob sie durch irgendwelche Veränderungen bei der Darstellung der Präparate im Sinne Pringsheims oder Erlenmeyers bedingt sind, läßt sich aus unseren Versuchen nicht ohne weiteres entnehmen.

So viel glauben wir aber sagen zu können, daß die Möglichkeit des ursprünglichen Vorhandenseins von d-Asparagin nicht von der Hand zu weisen ist, da auch die unter allen Kautelen hergestellte Substanz aus Wicken niedriger drehende Fraktionen von der Zusammensetzung des Asparagins ergibt. Wenn die Polarisationsabnahmen hier nur gering sind, so läßt sich dies ungezwungen daraus erklären, daß der Gehalt des natürlichen Produkts an dem entgegengesetzt drehenden Asparagin offenbar nur klein ist. In dieser Hinsicht sei daran erinnert, daß Piutti, der sehr große Mengen Rohmaterial verarbeitet hat, nur etwa 1,5 % d-Asparagin neben l-Asparagin isolieren konnte. Wenn uns eine weitere Anreicherung das d-Asparagin durch Krystallisation nach dem beschriebenen Verfahren nicht gelang, so dürfte das wohl darauf zurückzuführen sein, daß wir von zu geringen Mengen Substanz ausgegangen sind.

Veränderung des Asparagins beim Kochen in wässeriger Lösung.

Um zu untersuchen, welche Veränderungen Asparagin in kochendem Wasser erleiden kann, haben wir zunächst in ähnlicher Weise, wie H. Pringsheim beschrieben hat, das Asparagin längere Zeit am Rückflußkühler gekocht und die abgeschiedenen Fraktionen auf Zusammensetzung und Drehung untersucht. Wir konnten dabei die Beobachtungen Pringsheims im allgemeinen bestätigen, besonders auch das Auftreten von d-Asparagin, das sich in einem Falle isolieren ließ. Bei lang andauerndem Kochen der Asparaginlösung machten wir indessen einige bisher noch nicht beschriebene Beobachtungen über Veränderungen des Asparagins, die uns veranlaßten, unsere Untersuchungen in anderer Richtung fortzusetzen.

Es wurden zunächst 10 g Asparagin in 100 g Wasser 12 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das Kochen geschah in der von Pringsheim angegebenen Weise in einem Jenenser Kölbchen von 300 ccm Inhalt, das vorher mit Salzsäure und dann mehrmals mit Wasser ausgekocht war. Die am Ende des Versuchs schwach gelb gefärbte Lösung krystallisierte beim Abkühlen. Durch weiteres Einengen auf dem Wasserbade wurden außer der zuerst gewonnenen Krystallisation noch zwei Fraktionen sukzessive abgeschieden.

Aus 10 g eines Kahlbaumschen Präparates in 100 g H_2O wurden nach 12stündigem Kochen in dieser Weise folgende Fraktionen zurückgewonnen, nachdem am Ende des Versuchs 10 ccm der Flüssigkeit zu anderen Zwecken abgenommen worden waren.

1. Fraktion: 6,59 g Krystalle.

0,1346 g Substanz (lufttrocken) 0,1579 g CO_2; 0,0845 g H_2O.

$C_4H_8O_3N_2 + H_2O$ Ber.: C 32,0; H 6,67.

Gef.: C 32,0; H 7,02.

$$[\alpha]_D^{20} = + 34{,}49^0 \text{ in } 10\,^0/_0 \text{ HCl.}$$

2. Fraktion: 0,58 g Krystalle.

0,0962 g Substanz (lufttrocken) 0,1123 g CO_2; 0,0604 g H_2O.

$C_4H_8O_3N_2 + H_2O$ Ber.: C 32,0; H 6,67.

Gef.: C 31,84; H 7,03.

$$[\alpha]_D^{20} = + 32{,}15^0 \text{ in } 10\,^0/_0 \text{ HCl.}$$

3. Fraktion: 0,09 g Krystalle von süßem Geschmack. d-Asparagin!

$$[\alpha]_D^{20} = + 6{,}2^0 \text{ in Wasser.}$$

4. Fraktion: 1,81 g gelblicher zäher Sirup (über Schwefelsäure getrocknet), der auch nach längerem Stehen nicht krystallisiert.

$$[\alpha]_D^{20} = - 6{,}9^0 \text{ in Wasser}$$

$$[\alpha]_D^{20} = - 2{,}7^0 \text{ in } 10\,^0/_0 \text{ HCl.}$$

Aus 10 g desselben Kahlbaumschen Präparates in 100 ccm Wasser wurden dagegen nach 24stündigem Kochen bei vollständiger Aufarbeitung folgende Fraktionen gewonnen:

1. Fraktion: 5,89 g Krystalle.

$$[\alpha]_D^{20} = + 34{,}06^0 \text{ in } 10\,^0/_0 \text{ HCl.}$$

2. Fraktion: 1,21 g Krystalle.

$$[\alpha]_D^{20} = - 2{,}84^0 \text{ in Wasser.}$$

3. Fraktion: 2,82 g gelbbrauner, auch bei längerem Stehen nicht krystallisierender Sirup.

$$[\alpha]_D^{20} = - 6{,}03^0 \text{ in Wasser.}$$

$$[\alpha]_D^{20} = - 1{,}35^0 \text{ in } 10\,^0/_0 \text{ HCl.}$$

Wir konnten also auch in ähnlicher Weise wie Pringsheim nach 12stündigem Kochen aus den letzten Fraktionen eine Substanz isolieren, die in allen ihren Eigenschaften mit dem d-Asparagin identisch war. Ihre Menge war allerdings nur gering (0,09 g aus 9 g ursprünglicher Substanz). Durch vorsichtiges Verdunsten aus wässeriger Lösung erhielten wir große, gut ausgebildete Krystalle vom Drehungsvermögen des d-Asparagins, deren Untersuchung im Mineralogischen Institut der Kgl. Universität Breslau (Direktor Geheimrat Prof. Dr. Hintze) ergab, daß sie mit Krystallen von l-Asparagin verglichen die gleichen Krystallwinkel aufwiesen, mit diesen aber enantiomorph waren. Bei mehrfacher Wiederholung der Versuche mit Präparaten verschiedener Herkunft kamen wir im wesentlichen zu denselben Ergebnissen. Wurde indes die Kochdauer länger ausgedehnt, so zeigte sich eine Abnahme der krystallisierten Fraktionen, während die Menge des d-Asparagins, das sich als solches isolieren ließ, nicht zuzunehmen schien. Daraus war bereits zu folgern, daß es nicht sehr wahrscheinlich ist, daß bei der üblichen Darstellungsweise sich das d-Asparagin erst beim Eindampfen der Lösungen durch Racemisierung aus l-Asparagin bildet, sondern daß es schon von vornherein in den natürlichen Produkten enthalten ist, wie das auch aus den interessanten Untersuchungen Erlenmeyers über diese Frage hervorzugehen scheint.

Was uns nun aber bei unseren Versuchen besonders auffiel und was in der Literatur bis jetzt noch nicht genügend hervorgehoben ist, war die Tatsache, daß sich regelmäßig beim längeren Kochen von Asparaginlösungen eine Abspaltung von Ammoniak beobachten ließ und daß ferner scheinbar parallel der Abspaltung die Umwandlung des Asparagins in eine nicht krystallisierte amorphe Substanz erfolgte. Wie das schon die beiden obigen Versuche zeigen, wurde bei der Fraktionierung des Asparagins sowohl nach 12 sowie 24stündigem Kochen aus den leichter löslichen Fraktionen schließlich ein Sirup erhalten, der auch nach wiederholtem Aufnehmen und Eindampfen mit Wasser selbst bei sehr langer Aufbewahrung keine Spur einer Krystallisation mehr ergab. In dem 12-Stunden-Versuch betrug seine Menge 1,81 g, seine Drehung in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20} = -6,9^{\circ}$, in salzsaurer Lösung $[\alpha]_D^{20} = -2,7^{\circ}$. Nach weiterem 12stündi-

gem Kochen derselben Quantität Asparagin nahm seine Menge bei sonst gleicher Behandlung der gekochten Lösung, wie der 24-Stunden-Versuch zeigt, deutlich zu (2,82 g), während die Drehungsrichtung in salzsaurer und wässeriger Lösung dieselbe blieb, und die Drehungsgröße nur eine geringe Abnahme erfuhr.

In beiden Versuchen war nach dem Kochen ein deutliches Auftreten von Ammoniak wahrnehmbar. Beide Lösungen ergaben nach dem Kochen abgekühlt mit Neßlers Reagens versetzt sofort eine starke Ammoniakreaktion, der 24-Stunden-Versuch stärker als der 12-Stunden-Versuch. Um die Menge des in der Lösung enthaltenen freien Ammoniaks zu bestimmen, wurden im 12stündigen Kochversuch nach Beendigung des Kochens 10 ccm der Lösung abgenommen, mit Magnesiumoxyd versetzt, destilliert und das Destillat in $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure aufgefangen. Die in üblicher Weise titrierte Lösung ergab, daß in der Gesamtlösung des 12-Stunden-Versuchs 0,187 g freies Ammoniak entsprechend 16,9% zersetzten Asparagins enthalten war. Diese Menge Ammoniak war also während des Versuchs aus dem Asparagin abgespalten.

Beim Abdampfen der längere Zeit gekochten Asparaginlösungen entwich das abgespaltene Ammoniak zum großen Teil, doch ließ es sich auch in den mehrfach mit Wasser eingedampften Sirupen immer noch deutlich nachweisen. Erlenmeyer, der unabhängig von uns über ähnliche Beobachtungen der Entstehung einer amorphen Substanz bei langem Kochen von Asparaginlösungen berichtet[1]), glaubt annehmen zu müssen, daß es sich hier um eine amorphe Asparaginmodifikation handelt, und gibt ausdrücklich an, daß er nur eine spurenweise Abspaltung von Ammoniak aus Asparagin feststellen konnte. Wir können uns diese Differenzen zwischen seinen und unseren Beobachtungen nur dadurch erklären, daß Erlenmeyer wahrscheinlich nur kürzere Zeit gekochte Asparaginlösungen auf Ammoniak geprüft hat und nicht in Berücksichtigung zog, daß bereits schon beim Kochen und besonders bei dem späteren Abdampfen der Lösungen nicht unbeträchtliche Mengen Ammoniak entweichen.

Durch eingehende Versuche haben wir nun im folgenden feststellen können, daß bei langdauerndem Sieden wässe-

[1]) Erlenmeyer, diese Zeitschr. 52, 460, 1913.

riger Asparaginlösungen proportional der Erhitzungsdauer der Säureamidstickstoff des Asparagins in Form von Ammoniak abgespalten wird, und daß hierbei das Asparagin sich teilweise in eine gelblich gefärbte amorphe Substanz verwandelt, die sich nach unseren bisherigen Feststellungen weder mit Asparagin noch mit Asparaginsäure identifizieren ließ.

Versuche über die Abspaltung von Ammoniak aus Asparagin und die Entstehung einer amorphen Substanz beim Kochen seiner wässerigen Lösungen.

Die folgenden Versuche wurden in derselben Weise wie oben beschrieben durchgeführt. Wir benutzten hierzu stets denselben gereinigten Jenenser Kolben von 300 ccm Inhalt. Es wurden jedesmal 10 g Asparagin in 100 ccm destilliertem Wasser unter Benutzung eines kräftig wirkenden Rückflußkühlers gekocht. Um bei längerer Kochdauer Ammoniakverluste zu verhüten, wurde die obere Mündung des Kühlers mit einem großen Gärverschluß aus Glas verbunden, in den eine bestimmte Menge $^{n}/_{1}$-Schwefelsäure zuvor eingefüllt war. Nach verschieden langer Kochdauer wurde die betreffende Lösung abgekühlt und ein aliquoter Teil davon zur Bestimmung des beim Kochen abgespaltenen Ammoniaks abgenommen, die in der Weise geschah, daß man die Flüssigkeit mit Magnesia kochte und die Menge abdestillierten Ammoniaks nach Auffangen in $^{n}/_{10}$-Schwefelsäure in der üblichen Weise bestimmte. Hierzu wurde die Ammoniakmenge gerechnet, die sich bei der Rücktitration der Säure in dem Gärverschluß ergab.

Durch 2 bis 3 maliges sukzessives Eindampfen der Hauptlösung wurden die krystallisierbaren Anteile möglichst vollständig abgeschieden und ihre Menge jedesmal im Ganzen bestimmt. Ebenso wurde die Menge des schließlich verbleibenden Sirups nach mehrtägigem Stehen über Schwefelsäure festgestellt.

In der folgenden Tabelle sind die erhaltenen Zahlen für die nach verschieden langer Kochdauer zurückgewonnenen Krystall- und Sirupmengen nebeneinander angegeben und parallel dazu die gleichzeitig gebildete Gesamtmenge des beim Kochen aus Asparagin abgespaltenen Ammoniaks, aus der sich die Quantität des zersetzten Asparagins berechnen ließ.

In den Fällen, wo in der Tabelle einzelne dieser Zahlen fehlen, wurden die Versuche in anderer Weise aufgearbeitet.

10 g Asparagin in 100 ccm Wasser gekocht.

Nr.	Koch-dauer Std.	Nach d. Eindampfen auskrystallisierende Subst. g	Zurückbleibender Sirup g	Im ganzen abgespaltenes Ammoniak g	Entspricht zersetztem Asparagin %	Bemerkungen
1	12	7,99	1,99	0,187	16,5	
2	12	8,00	1,98	0,177	15,6	
3	12	7,57	1,61			Präparat aus Wicken.
4	24	7,10	2,82			
5	72	1,04	8,8	0,665	59	Gasförmig entweichendes Ammoniak nicht mitbestimmt.
6	72			0,712	63	
7	150		zunächst nur Sirup	1,064	94	
8	162	1,13	10,8 (dünnflüssig)			

Wie aus den Versuchen deutlich ersichtlich ist, nimmt die Menge des aus Asparagin abgespaltenen Ammoniaks mit der Länge der Kochdauer merkbar zu und erreicht in etwa 160 Stunden ihren Höchstbetrag, der fast genau der Hälfte des im Asparagin enthaltenen Stickstoffs entspricht. Da es bekannt ist, daß Säureamide durch Kochen mit Wasser zur freien Säure und Ammoniak verseift werden, so läßt sich folgern, daß auch beim Asparagin die Abspaltung des Ammoniaks nur an der Säureamidgruppe vor sich gehen kann, und es ist also aus den nach dem Versuch gefundenen Ammoniakmengen ohne weiteres auf die Menge des beim Kochen zersetzten Asparagins zu schließen. Eine Abspaltung von Ammoniak ist schon bei 12stündigem Kochen des Asparagins, wie bereits früher bewiesen, deutlich wahrnehmbar, und zwar zeigen Versuch 1 und 2 in guter Übereinstimmung, daß in dieser Zeit bereits 16,5 bzw. 15,6% Asparagin gespalten sind. In 72 Stunden beträgt die Menge des zersetzten Asparagins schon 63%, in 150 Stunden ist sie auf 94% gestiegen. Die Hauptmenge des Ammoniaks wurde nach Beendigung des Versuchs stets in der Lösung gefunden. In der Vorlage war nach 12 Stunden gewöhnlich noch kein Ammoniak nachweisbar, dagegen zeigte es sich, daß in dem Versuch mit 72 Stunden Kochdauer der Kolbeninhalt stark nach Ammoniak roch und sich in der vorgelegten Schwefelsäure 0,102 g Ammoniak angesammelt hatte, die neben den in der

Lösung verbliebenen 0,6101 g Ammoniak abgespalten waren. Nach 150 Stunden hatten sich sogar bis zu 0,1767 g Ammoniak in der Vorlage angesammelt.

Die äußere Beschaffenheit der Lösung änderte sich mit der Erhitzungsdauer. Nach 12 bis 24 Stunden war die ursprünglich farblose Lösung schwach gelb gefärbt. Bei weiterem Kochen nahm die Färbung beträchtlich zu, und die nach 150 Stunden erzielten Flüssigkeiten zeigten eine deutliche gelbbraune Färbung. Bei 12 stündiger Kochdauer krystallisierte beim Abkühlen der Lösung gewöhnlich ein großer Teil des Asparagins über Nacht aus. Dagegen war es schon von vornherein auffallend, daß bei den Versuchen mit 24 stündiger und längerer Kochdauer sich bei sonst gleichen Bedingungen diese Krystallisationserscheinungen nicht zeigten, daß also das noch unveränderte Asparagin offenbar durch Ammoniak und andere Substanzen in Lösung gehalten war.

Wie die obige Zusammenstellung zeigt, nimmt der bei Aufarbeitung der Lösung zurückgewonnene krystallisierende Anteil mit der Dauer des Kochens allmählich ab, während die Bildung der nicht krystallisierenden amorphen Substanz in demselben Maße zunimmt. Diese Zunahme scheint aber proportional der von uns beobachteten Ammoniakabspaltung aus Asparagin zu erfolgen, so daß wir aus unseren Versuchen den Schluß ziehen möchten, daß die Bildung der amorphen Substanz beim Kochen wässeriger Asparaginlösungen mit der Abspaltung von Ammoniak aus Asparagin in irgendeinem bestimmten Zusammenhang steht.

Wir haben uns dann noch eingehend mit der Natur der nach Abscheidung der krystallisierenden Bestandteile aus den gekochten Lösungen verbleibenden Sirupe beschäftigt, sind dabei aber vorläufig zu keinen abschließenden Resultaten gekommen.

Wenn man die Verarbeitung in der Weise vornimmt, daß man nach dem Kochen die Lösung auf dem Wasserbade stark einengt, so läßt sich gewöhnlich oder wenigstens in den Versuchen mit 24 bis 72 Stunden Kochdauer regelmäßig die Abscheidung der Hauptmenge des krystallisierenden Anteils erzielen. Wurde dagegen die Mutterlauge dieser Krystalle nochmals auf dem Wasserbade konzentriert, so schieden sich weitere Krystalle ab, deren Menge durch eine nochmalige Operation meist noch eine geringe Zunahme erfuhr. Der dann verbleibende gelb-

liche Sirup trocknete im Exsiccator über Schwefelsäure zu einer zähen Gallerte ein, die auch nach mehrtägiger Aufbewahrung keine Krystallisation mehr erkennen ließ. Bei den länger gekochten Lösungen gestaltete sich die Abscheidung von fester Substanz unter den gleichen Versuchsbedingungen wesentlich schwieriger, und nach 150stündigem Kochen war sogar in einem Falle beim einmaligen Eindampfen der Lösung direkt nur ein Sirup zu erhalten, der auch nach mehrtägigem Stehen zunächst keine Spur von Krystallen ergab, wie Versuch 7 zeigt.

Die nähere Untersuchung der bei verschieden langer Kochdauer erhaltenen Sirupe zeigte nun, daß sie keineswegs einheitlicher Natur sind, daß vielmehr je nach der Art der Versuchsbedingungen sehr kompliziert zusammengesetzte Substanzgemische auftreten können. Zunächst ist zu betonen, daß sie regelmäßig Ammoniak enthielten, und zwar in den Versuchen mit längerer Kochdauer mehr. Auch schwankte die Ammoniakmenge im Sirup je nach der Art des Eindampfens der Lösungen und der Mutterlaugen. Durch wiederholtes Aufnehmen mit Wasser und Eindampfen ließ sich ein großer Teil des Ammoniaks aus den Sirupen entfernen, doch war auch bei häufiger Wiederholung dieser Operation in den schließlich resultierenden Sirupen oder Gallerten mit Neßlerschem Reagens stets freies Ammoniak nachweisbar.

Außer dem Ammoniak war der bemerkenswerteste Bestandteil aller Sirupe eine gelblich bis bräunlich gefärbte amorphe Substanz, deren Abtrennung vom Ammoniak und von anderen Substanzen in dem Sirup sich große Schwierigkeiten entgegenstellten. Von diesen anderen Substanzen waren fast in allen Sirupen Asparagin und in den Versuchen mit längerer Kochdauer offenbar durch Verseifung gebildete Asparaginsäure anzutreffen, die in den kürzer dauernden Versuchen meist in aktiver Form, in den länger andauernden dagegen in inaktiver Form vorlagen. Beide Verbindungen werden offenbar durch Ammoniak und die erwähnte amorphe Substanz in nicht unbeträchtlichen Mengen hartnäckig in Lösung gehalten, und wie wir uns wiederholt überzeugt haben, gelingt es oft erst nach sehr häufigem Eindampfen mit Wasser einen Teil dieser Verbindungen zur Abscheidung zu bringen, wobei wahrscheinlich immer noch ein nicht krystallisierender Anteil in dem Sirup verbleibt.

Daß selbst Sirupe, die nach sehr langer Aufbewahrungszeit keine Spur von Krystallisation mehr zeigten, ein Gemenge verschiedener Substanzen enthielten, zeigt allein schon die im folgenden ausgeführte Bestimmungsmethode der darin vorhandenen Stickstoffformen. Zu diesem Zweck wurde ein Sirup verwandt, der nach 72stündigem Kochen aus 10 g Asparagin gewonnen war, nachdem man durch dreimaliges Eindampfen sukzessive drei Krystallfraktionen im Gesamtgewicht von 1,04 g abgeschieden hatte. Der Sirup ergab bei nochmaligem Aufnehmen mit Wasser und Eindampfen keine Krystallisation. Über Schwefelsäure im Exsiccator aufbewahrt, trocknete er zu einer gelbbraunen, hornartigen Masse im Gewicht von 8,8 g ein, die auch nach mehreren Wochen keine Spur eines Krystallansatzes zeigte.

In diesem getrockneten Produkt wurde zunächst eine Gesamtstickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt. Ferner wurde darin das nach Zusatz von Magnesia abdestillierbare Ammoniak und außerdem der nach 6stündigem Kochen mit 20%iger Salzsäure am Rückflußkühler abspaltbare Säureamidstickstoff bestimmt. Aus der Differenz ließ sich schließlich der noch vorhandene Aminosäurestickstoff berechnen.

Danach enthielt die getrocknete Sirupmasse 17,2% Gesamt-N. Dieser Gesamtstickstoff setzte sich nach den Analysen zusammen aus:

0,4719 g freier Ammoniak-N = 31,2% des Gesamt-N
0,1836 g Säureamid-N . . . . = 12,1% " "
0,8582 g Aminosäure-N . . . = 56,6% " "

Die untersuchte Sirupmasse enthält also nach der beschriebenen Behandlung immer noch deutliche Mengen von Ammoniak, wahrscheinlich in Form von Ammonsalzen. Recht beträchtlich erscheint auch die Menge des Säureamidstickstoffs. Nimmt man an, daß diese dem Asparagin zukommt, so wären immerhin noch 1,97 g daraus berechnet in dem Sirup eingeschlossen.

Bei den Versuchen mit 12 bis 72stündiger Kochdauer, die bei dem Einengen der Lösungen optisch-aktive Krystallfraktionen ergeben hatten, wurden aus den Mutterlaugen auch stets optisch-aktive Sirupmassen gewonnen. Die Sirupe drehten regelmäßig nach links, und zwar in wässeriger Lösung wesent-

lich stärker als in salzsaurer. Bei langdauernder Erhitzung der wässerigen Asparaginlösung schien die Drehung der daraus resultierenden Sirupe allmählich abzunehmen. Beim längeren Erhitzen der optisch-aktiven Sirupe mit Salzsäure machte sich keine wesentliche Änderung der Drehung in salzsaurer Lösung bemerkbar.

Spezifische Drehung der getrockneten Sirupe aus gekochten Asparaginlösungen in wässeriger und salzsaurer Lösung sowie nach dem Erhitzen mit Salzsäure.

Kochdauer	$[\alpha]_D^{20}$ in Wasser	$[\alpha]_D^{20}$ in 10% HCl	$[\alpha]_D^{20}$ in 10% HCl nach dem Erhitzen mit Salzsäure
12	—6,90°	—2,70°	—2,05°
24	—6,03°	—1,35°	—1,26°
72	—2,48°	—0,38°	—0,25°

Die Drehungsrichtung unserer sirupösen Substanzen ist also die gleiche, wie sie E. Erlenmeyer, der auch die Bildung einer amorphen Substanz beim Kochen von Asparagin beobachtete, in einem Falle feststellen konnte; er fand nämlich in salzsaurer Lösung $[\alpha]_D^{20} = -4,9^0$, in wässeriger Lösung $[\alpha]_D^{20} = -7,6^0$.

Dehnt man das Kochen der Asparaginlösungen sehr lange aus, so kommt man schließlich nur zu inaktiven Produkten, die offenbar durch einen Racemisierungsprozeß aus den ursprünglich aktiven entstanden sind.

Wir haben dann endlich noch eine solche sehr lange gekochte (150 Stunden) Asparaginlösung weiter aufgearbeitet, um die Isolierung der darin scheinbar angereicherten amorphen Substanz zu versuchen.

Zu diesem Zwecke wurden 10 g Asparagin mit 100 ccm Wasser 150 Stunden lang gekocht, und die bräunlich gefärbte stark ammoniakhaltige Lösung auf dem Wasserbade zum Sirup eingeengt, wobei sehr beträchtliche Mengen Ammoniak entwichen. Der nach dem Trocknen gallertartige Rückstand ergab mehrmals mit Wasser aufgenommen und eingedampft, wobei immer wieder Ammoniak entwich, zunächst keine Krystallisation. Als aber diese Art der Behandlung unzählige Male wiederholt worden war, begann aus dem eingedampften Sirup nach längerem Stehen die Abscheidung von Krystallen,

deren Menge abgesaugt und getrocknet 3,1 g betrug. Aus der Mutterlauge ließ sich noch eine Krystallfraktion von 1,9 g abscheiden, so daß also im ganzen ca. 5 g krystallinische Produkte erhalten wurden. Bei weiterer Behandlung des zuletzt verbleibenden Sirups war dann eine Krystallisation unter keinen Bedingungen mehr zu erzielen.

Die erste Fraktion der ausgeschiedenen Krystalle (3,1 g) wurde aus Wasser umkrystallisiert. Das erhaltene Produkt schied sich aus der gesättigten Lösung in Form mikroskopisch feiner Kryställchen ab, die ein von Asparagin verschiedenes Aussehen zeigten. Ihr Zersetzungspunkt lag bei 224 bis 227°. In wässeriger und salzsaurer Lösung war die Substanz vollkommen inaktiv. Sie gab direkt untersucht mit Neßlerschem Reagens keine Ammoniakreaktion, nach dem Kochen in salzsaurer Lösung war dagegen Ammoniak in geringer Menge nachweisbar. Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1797 g Substanz. 17,9 ccm N (19°, 763 mm); 0,1544 g Substanz. 0,2031 g CO_2; 0,0775 g H_2O.

		Gef.:	N 11,69; C 35,88; H 5,62.
Für Asparaginsäure	$C_4H_7O_4N$	Ber.:	N 10,53; C 36,08; H 5,31,
„ Asparagin	$C_4H_8O_3N_2$	„ :	N 21,21; C 36,36; H 6,06.

Wie die Analysen zeigen, scheint die isolierte Substanz aus einem Gemisch von viel inaktiver Asparaginsäure neben wenig inaktivem Asparagin zu bestehen. Die beim Umkrystallisieren weiterhin erhaltenen Krystalle, die bei 219° schmolzen, wiesen im wesentlichen dieselben Eigenschaften auf.

Der oben erwähnte zurückbleibende Sirup, der bräunlich gefärbt war und immer noch Ammoniak enthielt, wurde mit überschüssigem Kupfercarbonat gekocht. Das erhaltene dunkelblau gefärbte Filtrat ergab beim Einengen auf dem Wasserbade ein blaues Kupfersalz (1,7 g), anscheinend asparaginsaures Kupfer. Die Mutterlaugen des vollständig abgetrennten Kupfersalzes zeigten eine dunkelgrüne Farbe. Beim Eindampfen ließ sich daraus nur ein blaugrüngefärbter Sirup (3,5 g) gewinnen, der nicht mehr krystallisierte. Nach Entfernung des Kupfers mit Schwefelwasserstoff wurde aus ihm ein bräunlich aussehender Sirup (2,6 g) zurückgewonnen, der noch ammoniakhaltig war. Bemerkenswert ist, daß sich aus diesem Sirup nach dem Eindampfen mit Salzsäure nur Chlorammonium und keine Asparagin-

säure abscheiden ließ. Vielleicht ist hier ein Weg gegeben, um die amorphe Substanz von den anderen im Sirup enthaltenen Substanzen abzutrennen.

Wie unsere Versuche zeigen, handelt es sich bei den Veränderungen, die Asparagin in wässeriger Lösung bei langdauerndem Kochen erfährt, um offenbar recht komplizierte chemische Vorgänge, die sich bisher noch nicht genügend klar übersehen lassen. Soviel möchten wir aber doch aus unseren Versuchen bereits folgern, daß die erste Phase dieser Reaktionen die sich schon innerhalb von 12 Stunden Kochdauer merkbar vollzieht, in einer Verseifung des Asparagins zu Asparaginsäure und Ammoniak besteht. Die hierbei gebildete Asparaginsäure scheint, vielleicht im Stadium der Entstehung, zum Teil eine eigentümliche, bisher nicht beobachtete Umlagerung oder Kondensation zu einer amorphen Substanz zu erleiden, die vermutlich keine Aminosäure mehr darstellt. Bei sehr langandauerndem Kochen scheint außerdem noch Racemisierung des Asparagins, der entstandenen Asparaginsäure und sonstiger ursprünglich aktiver Umsetzungsprodukte zu erfolgen.

Daß die Verseifung des Asparagins zu asparaginsaurem Ammoniak der Umwandlung des Asparagins in eine amorphe Substanz vorausgeht, läßt sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus einem Versuche folgern, den wir schon vor längerer Zeit angestellt haben, und bei dem saures asparaginsaures Ammonium unter gleichen Bedingungen wie Asparagin in wässeriger Lösung unter Rückfluß gekocht wurde. Dampft man nämlich Lösungen aus 1 Mol. Asparaginsäure und 1 Mol. Ammoniak ohne weitere Behandlung auf dem Wasserbade ein, so erhält man nur Asparaginsäure neben asparaginsaurem Ammonium krystallisiert zurück. Wurden aber 10 g Asparaginsäure mit der für saures asparaginsaures Ammonium berechneten Ammoniakmenge in 100 ccm Wasser rückfließend 160 Stunden gekocht, so ließen sich nach der wie früher vorgenommenen Aufarbeitung der Lösung nur 2,8 g krystallinische Produkte zurückgewinnen, während gleichzeitig 9,7 g eines bräunlich gefärbten Sirups von ganz ähnlichen Eigenschaften wie aus Asparagin erhalten wurden. Mit der weiteren Untersuchung dieser Sirupe sind wir noch beschäftigt.

Über die Oxydation von Gallussäure und Gallusgerbsäure (Tannin) an der Luft in Gegenwart von Alkalien und über eine Farbenreaktion von Blei.

Von

Omer Schewket (Türkei).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 1. Juli 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

Wenn man Gallussäurelösung über eine Lösung von Alkali schichtet, ohne zu bewegen, so erscheinen drei farbige Zonen. Der obere Teil ist grün, der untere rosa, und zwischen beiden Schichten befindet sich eine gelbliche Färbung. Diese Nuancen scheinen bestimmten Oxydationsstufen der Gallussäure zuzukommen. Der schwächsten Oxydation entspricht die grüne und der Endoxydation die rosa Färbung.

Bei kräftigem Umschütteln nimmt die Lösung direkt eine orangerote Färbung an, die einem Oxydationsendprodukt eigen sein dürfte.

Ähnlich verhält sich Tannin in alkalischer Lösung, die grüne Nuance fehlt jedoch.

Wenn man eine beständige Lösung der grünen wie der roten Substanz erhalten will, so muß man folgendermaßen verfahren: In ein Reagensglas bringt man 1 ccm Gallussäurelösung, verdünnt dieselbe mit 10 ccm destilliertem Wasser, fügt 5 ccm Alkohol und tropfenweise $10^0/_0$ige Lauge (KOH oder NaOH), 3 bis 10 Tropfen, hinzu. Man schüttelt $^1/_2$ Minute kräftig um, wobei eine sehr schöne grüne Färbung eintritt.

Ohne Alkoholzusatz geht die Probe ebenso gut, aber man darf dann nur 1 bis 5 Tropfen Lauge anwenden und muß nach jedem Zusatz $^1/_4$ Minute kräftig umschütteln. Diese grüne Färbung

ist die Nuance, die bei schwächster Oxydation von Gallussäure auftritt. Wenn man dagegen überschüssige Lauge benutzt, so nimmt beim Umschütteln die Lösung gleich einen orangeroten Ton an, der eben einer Endoxydation von Gallussäure entspricht.

Ebenso wie die Ätzalkalien geben die **Erdalkalihydroxydlösungen** mit **Gallus- und Gallusgerbsäure** (Tannin) sowie auch mit **Pyrogallol** gefärbte Flüssigkeiten, die verschiedenen Oxydationsprodukten entsprechen. Bei stärkeren Konzentrationen entstehen farbige Fällungen.

Es hat sich herausgestellt, daß bei diesen Reaktionen der Luftsauerstoff beteiligt ist. Das läßt sich folgendermaßen zeigen:

1. Man stellt die obigen Proben nach Zusatz von etwas 5%iger Stannochloridlösung an; dann tritt gar keine Färbung ein. Das zugefügte Reduktionsmittel verhindert die Oxydation.

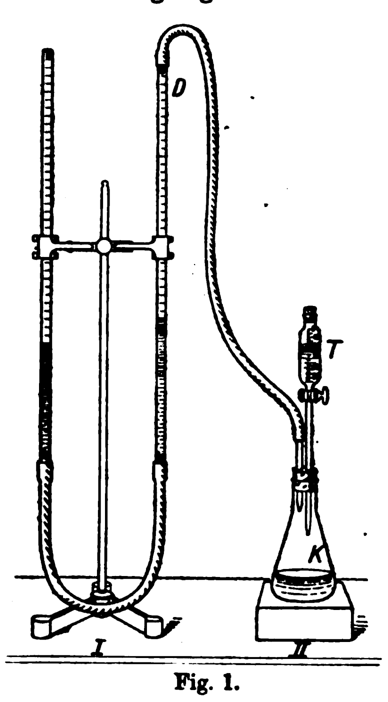


Fig. 1.

2. Um ganz sicher zu sein, muß man den bei der Oxydation verbrauchten Luftsauerstoff messen. Der zu diesem Zweck dienende Meßapparat (Fig. 1) setzt sich aus zwei Teilen (*I* und *II*) zusammen.

I besteht aus zwei Büretten, die durch einen Kautschukschlauch miteinander verbunden und mit irgendeiner gefärbten Lösung zur Hälfte gefüllt sind.

II ist ein Erlenmeyerkolben *K* von 400 ccm Inhalt. Er trägt einen doppelt durchbohrten Gummistopfen, durch dessen eine Bohrung ein graduierter Tropftrichter *T* (0—50 ccm) führt, während die andere Bohrung das mit der einen Bürette durch Schlauch verbundene Glasrohr trägt.

Man versetzt den Erlenmeyerkolben mit 0,2 g Gallussäure und 50 ccm destilliertem Wasser und verbindet die Büretten,

wie in der Figur ersichtlich, mit dem Erlenmeyerkolben. Man stellt nun zuerst das Flüssigkeitsniveau in den beiden Büretten gleich und liest die Kubikzentimeterzahl an Bürette *D* ab. Alsdann läßt man 5 ccm $5\,^0/_0$ige Lauge aus dem Tropftrichter einfließen und schüttelt kräftig um, wobei die erwähnte schöne Grünfärbung eintritt. Gleichzeitig bemerkt man ein Aufsteigen der Flüssigkeit in der Bürette *D*.

Nach $^1/_2$ stündigem Stehen stellt man die Niveaus wieder gleich und liest ab. Bei der Berechnung muß man die zugeflossene Laugenmenge berücksichtigen. Wenn z. B. vor Beginn der Probe das Niveau der Bürette *D* auf 32 stand und nach der Behandlung mit Lauge sowie nach dem Umschütteln der Stand 12,35 war, so findet man, daß die absorbierte Quantität Sauerstoff ist:

$$O = 32 + 5 - 12,35 = 24,65 \text{ ccm.}$$

Fügt man aus dem Tropftrichter noch weiter Lauge hinzu und schüttelt stets nach Zugabe von je 5 ccm kräftig um, so findet bis zum Verbrauch von 40 ccm merkliche Absorption statt. Dabei verwandelt sich die grüne Färbung in die gelbrote.

Nach $^1/_2$ stündigem Stehen liest man abermals ab. Ich fand 30,6 ccm.

Der Sauerstoffverbrauch ist also:

$$O = 12,35 + 40 - 30,6 = 21,75 \text{ ccm.}$$

Die gesamte Menge absorbierten Luftsauerstoffs betrug 46,4 ccm.

Ähnlich findet man für 0,2 g Tannin bei $^1/_2$ stündigem Stehenlassen eine Absorption von 21 ccm, für 0,2 g Pyrogallol eine solche von 53,5 ccm Luftsauerstoff.

Blei.

In ein Reagensglas gibt man einige Tropfen konzentrierte Bleisalzlösung (etwa $10\,^0/_0$ig) und verdünnt dieselbe mit 10 ccm destilliertem Wasser oder nimmt direkt 10 ccm von der verdünnten Lösung und fügt Natronlauge bis zur Wiederauflösung des Bleihydroxydniederschlages hinzu. Man verteilt die Lösung auf zwei Reagensgläser. In eines werden 1 bis 5 Tropfen $1\,^0/_0$ige Gallussäurelösung gegeben. Wenn man nicht bewegt, so sieht man unten eine sehr schöne carminrote und oben eine grüne

Zone, beim Umschütteln nimmt die ganze Masse carminrote Färbung an.

Für den sichern Ausfall der Probe muß immer Gallussäure weniger als Blei zugegen sein. (Diese Reaktion kann man auch zum Nachweise von Gallussäure sowie von Tannin [Gallusgerbsäure] benutzen.)

Man gießt in das zweite Reagensglas 1 bis 4 ccm 1 %ige Gallussäurelösung, wobei eine prächtige wiesengrüne Färbung eintritt. Die rote Färbung ist empfindlicher und charakteristisch für Blei. Wenn man die so erhaltene rote Lösung erhitzt oder ansäuert, so verschwindet die Färbung; wenn man nach dem Abkühlen kräftig umschüttelt bzw. Wasser und Lauge zusetzt, so tritt wieder Rotfärbung ein.

Durch diese Reaktion kann man im unlöslichen Bleisulfat Blei nachweisen:

Zu diesem Zwecke suspendiert man etwas Bleisulfat in 10 ccm destilliertem Wasser und erhitzt, dann fügt man tropfenweise Natronlauge hinzu, bis gerade Lösung erfolgt ist. Nach dem Erkalten setzt man 2 bis 5 Tropfen Gallussäurelösung zu, worauf die rote Färbung entsteht. (Unterschied von Bariumsulfat und von Kieselsäure.)

Unterscheidung der Gallussäure von Gallusgerbsäure (Tannin) bzw. Erkennung nebeneinander.

Man löst 0,3 g fester Substanz in 25 ccm destilliertem Wasser, fügt 25 ccm 2 %iger Coffeincitratlösung hinzu und filtriert. Der Niederschlag wird 3 mal mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Das klare Filtrat (*a*) enthält Gallussäure, im Rückstand befindet sich Tannin.

Die beiden Fraktionen prüft man folgendermaßen:

a) 1. Man nimmt 10 ccm vom klaren Filtrat, gießt langsam 5 ccm Alkohol längs der Wand des Reagensglases hinzu, ohne die Schichten durchzumischen. Dann fügt man einige Tropfen Natronlauge hinzu, wobei man in der alkoholischen Zone eine grüne Färbung entstehen sieht. (Unterschied der Gallussäure von Tannin.)

2. Man nimmt 10 ccm Filtrat, fügt tropfenweise von folgendem Reagens hinzu:

Bleiacetat (krystallisiert)	. . . . . .	0,2 g
Kalium- oder Natriumhydroxyd (fest)	.	5,0 g
Destilliertes Wasser	. . . .	100 ccm.

Nach Zusatz jeden Tropfens dieser Mischung schüttelt man um; dabei tritt wiesengrüne Färbung ein, die beim Stehen dunkler wird und auf Zusatz von verdünnter Säure (Essigsäure oder HCl) bordeauxrot wird. (Unterschied von Tannin.)

Das erwähnte Reagens gibt mit Tanninlösung eine braune bis rotgelbe Färbung bzw. Fällung.

3. Man nimmt 10 ccm vom Filtrat, behandelt mit etwas Bariumchloridlösung und fügt einige Tropfen Natronlauge hinzu; dabei entsteht ein blauer Niederschlag.

Diese drei Reaktionen sind charakteristisch für Gallussäure.

b) Man löst den Coffeintannin-Niederschlag in etwas heißem Alkohol und läßt erkalten.

1. Man nimmt von der alkoholischen Lösung 5 ccm und fügt einige Tropfen Natronlauge hinzu, dabei entsteht ein gelber bis rotgelber Niederschlag. Wenn man den so erhaltenen Niederschlag mit Wasser schüttelt, löst er sich mit gelbroter Farbe, während Gallussäure eine grüne Lösung liefert.

2. Man nimmt etwas von der alkoholischen Lösung, verdünnt mit der gleichen Menge destilliertem Wasser und fügt einige Kubikzentimeter Bariumchloridlösung und nach dem Umschütteln einige Tropfen Natron- oder Kalilauge hinzu, wobei ein grüner Niederschlag eintritt. Derselbe zeigt Tannin an.

Um diese Trennung zu erreichen, muß man immer von der festen Substanz frisch lösen, weil gelöstes Tannin beim Stehenlassen etwas Gallussäure abspaltet. Deswegen findet man meistens in alten Tanninlösungen bei obiger Arbeitsweise freie Gallussäure.

Über einige neue Farbenreaktionen von Di- und Triphenolen.

Von

Omer Schewket (Türkei).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 11. Juli 1913.)

1. Brenzcatechin.

In einem Reagensglas wird 0,01 g Brenzcatechin mit etwa 1 ccm dest. Wasser und 3 bis 5 Tropfen 1 $^0/_0$iger Jod-Jodkaliumlösung versetzt.

Alsdann verdünnt man mit etwas dest. Wasser und fügt einige Tropfen 5 $^0/_0$iger Natronlauge hinzu. Dabei entsteht sofort eine schöne grüne Färbung.

Beim Stehenlassen oder Kochen geht die grüne Färbung in ein mißfarbenes Braun über, aber nach Abkühlung oder kräftigem Umschütteln oder nach Zugabe von einigen Tropfen Wasserstoffsuperoxyd tritt die grüne Färbung wieder ein. (Unterschied von Resorcin und Hydrochinon, die hierbei beide keine grüne Färbung geben.)

Es ist schon bekannt, daß sich Brenzcatechin allein in alkalischer Lösung bei Luftzutritt langsam grün, dann braun, schließlich schwarz[1]) färbt. Resorcin für sich nimmt in alkalischer Lösung langsam gleichfalls eine grüne Färbung an; aber nach der Behandlung mit Jod liefert nur Brenzcatechin sofort die grüne Färbung. Diese Reaktion ist charakteristisch und empfindlich für Brenzcatechin.

---

[1]) J. Gadamer, Lehrbuch der chemischen Toxikologie, 1909, S. 392.

2. Pyrogallol.

1. In einem Reagensglas versetzt man etwa 0,05 g Pyrogallol mit 2 ccm dest. Wasser und 5 bis 10 Tropfen 1%iger Jod-Jodkaliumlösung. Nach dem Umschütteln verdünnt man mit etwas dest. Wasser und fügt alsdann einige Tropfen Natronlauge hinzu, wobei eine schöne, aber vergängliche blau-violette bis rot-violette Färbung eintritt. (Unterschied von Phloroglucin.)

2. In einem Reagensglas versetzt man eine Messerspitze Pyrogallol mit 10 ccm dest. Wasser und 5 bis 10 ccm Alkohol. Nach Abkühlung fügt man einige Tropfen Natron- oder Kalilauge hinzu, wobei allmählich eine violette Färbung eintritt.

Die entstehende Färbung ist sehr ähnlich der einer Permanganatlösungfarbe. (Unterschied von Phloroglucin, das sich bei gleicher Behandlung nicht so färbt.)

Um ein sicheres Resultat zu erhalten, muß man immer die alkoholische Lösung vor dem Laugezusatz gut abkühlen. Ohne Alkoholzugabe erscheint nur bei Gegenwart eines Calciumsalzes die erwähnte violette Färbung. Während aber diese Calciumreaktion schnell vergänglich ist, bleibt die mit Alkohol erhältliche Pyrogallolprobe stundenlang deutlich. Diese Reaktion ist charakteristisch für Pyrogallol.

3. Phloroglucin.

1. In einem Reagensglas wird 0,01 g Phloroglucin mit 5 ccm heißem dest. Wasser versetzt, alsdann fügt man tropfenweise 5 bis 10 Tropfen verdünnte Jod-Jodkaliumlösung (etwa 0,5% Jod enthaltend) hinzu; dabei verschwindet die Farbe der Jodlösung. Nach dieser Behandlung setzt man einige Tropfen Natronlauge hinzu, wobei eine hellbraune Färbung eintritt. Beim Kochen geht die Farbe in hellrot-violett über. (Unterschied von Pyrogallol.)

2. In einem Reagensglas versetzt man 0,01 g oder noch weniger Phloroglucin mit 5 ccm dest. Wasser und erhitzt bis zum Kochen; alsdann fügt man einige Tropfen Natronlauge hinzu und schüttelt 1 Minute lang kräftig um. Dabei wird Phloroglucin wohl in der Hitze vom Luftsauerstoff oxydiert, und es tritt eine prächtige blauviolette Färbung ein. Bequemer und schöner erhält man dasselbe Ergebnis bei folgender Arbeitsweise:

In einem Reagensglas wird ein wenig Phloroglucin mit 5 ccm dest. Wasser aufgekocht und mit einigen Tropfen Lauge versetzt. Alsdann gibt man einige Tropfen (5 bis 10) Wasserstoffsuperoxyd hinzu und schüttelt um. Dabei tritt eine kräftige und tagelang beständige blauviolette Färbung ein. Diese Reaktion ist empfindlich und charakteristisch für Phloroglucin. (Unterschied von Pyrogallol.)

Wenn man die so erhaltene blauviolette Lösung ansäuert, so geht die Farbe erst in hellrot, dann in hellgelb über. Nochmaliger Laugezusatz ruft dann die blauviolette Färbung wieder hervor.

Über Farbenreaktionen der Erdalkalien mit Oxygallolderivaten[1]).

Von

Omer Schewket (Türkei).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 2. Juli 1913.)

In der voraufgehenden Mitteilung[2]) habe ich dargelegt, daß Gallussäure, Tannin sowie Pyrogallol in Gegenwart von Ätzalkalien verschieden gefärbte charakteristische Oxydationsprodukte liefern. In Gegenwart von Erdalkalien treten nun andere Farbenreaktionen auf, die zu einem Nachweis und zur Erkennung der Erdalkalien verwendet werden können.

Anwendung der Farbenreaktion.

Calcium.

1. In einem Reagensglas versetzt man 1 ccm 2%ige frisch bereitete Tanninlösung mit 5 Tropfen 10%iger Natron- oder Kalilauge, alsdann gießt man langsam (calciumhaltiges) Leitungswasser oder 0,015%ige Calciumchloridlösung fast bis zum Rande des Reagensglases hinzu. Dabei tritt eine erst blaue, allmählich in grün übergehende Färbung ein. Diese Reaktion ist empfindlich für Calcium.

2. In einem Reagensglas versetzt man 5 ccm Calciumsalzlösung (0,2 bis 0,5%ig) mit 10 ccm Alkohol und mit 2 bis 3 Tropfen 1%iger Gallussäurelösung. Nach dem Umschütteln fügt man 5 bis 10 Tropfen Lauge hinzu; dabei ent-

---

[1]) Unter Oxygallolderivaten sollen hier Gallussäure, Tannin sowie Pyrogallol verstanden sein.

[2]) O. Schewket, diese Zeitschr. 54, 282, 1913.

steht zunächst eine rote Färbung und ein roter Niederschlag, beide gehen dann in Orangerot und endlich in Gelb über.

3. In einem Reagensglas werden 10 ccm starke Calciumsalzlösung mit 5 ccm Alkohol und 1 ccm 1 $^0/_0$ iger Gallussäurelösung versetzt. Nach dem Umschütteln fügt man 1 ccm 10 $^0/_0$ iger Lauge hinzu und läßt ohne zu bewegen stehen. Dabei entsteht ein feuerroter Niederschlag und die überstehende Flüssigkeit sowie der Niederschlag färben sich von obenher bei Luftzutritt allmählich blau, dann grün.

4. In einem Reagensglas versetzt man 10 ccm starke Calciumsalzlösung (stärker als 1 $^0/_0$) mit 1 ccm 1 $^0/_0$ iger Tannin- oder besser Gallussäurelösung und fügt 10 Tropfen bis 1 ccm 10 $^0/_0$ ige Natronlauge hinzu. Dabei entsteht ein rosa Niederschlag (Unterschied von Barium und Strontium). Wenn Calciumsalz mit der gleichen Quantität Tannin oder mit mehr Tannin zusammentrifft, so entsteht statt eines rosa Niederschlags eine schmutzig hellgrüne Fällung.

5. In einem Reagensglas mischt man 10 ccm starke Calciumsalzlösung, 5 ccm Alkohol und 1 ccm 1 $^0/_0$ ige Tanninlösung. Man schüttelt um und fügt 10 Tropfen Lauge hinzu; dabei tritt auch ein schmutzig-rosafarbener Niederschlag auf (Unterschied von Barium und Strontium).

6. In einem Reagensglas versetzt man 10 ccm Calciumsalzlösung mit einer Messerspitze Pyrogallol. Nach dem Umschütteln fügt man 2 bis 5 Tropfen Lauge oder Ammoniak hinzu. Dabei entsteht eine intensive, aber vergängliche violette Färbung (Unterschied von Barium und Strontium).

Strontium.

1. In einem Reagensglas werden 10 ccm sehr verdünnte Strontiumsalzlösung (0,02 bis 0,05 $^0/_0$) mit einer Messerspitze Tannin versetzt und umgeschüttelt, dann fügt man 5 Tropfen 10 $^0/_0$ iger Lauge hinzu, worauf eine sehr schöne bläulich-grüne Färbung eintritt. Durch diese Reaktion kann man in einer Strontiumsulfatlösung Strontium nachweisen. Wenn man hier eine stärkere Strontiumsalzlösung benutzt, so fällt ein dunkelgrüner Niederschlag aus, der längere Zeit grün bleibt, während Barium mit Tannin in Kürze in Schmutziggelb übergeht.

2. In einem Reagensglas werden 5 ccm verdünnte Stron-

tiumchloridlösung (ungefähr 0,2 bis 0,5 %ig) mit 10 ccm Alkohol und 2 bis 3 Tropfen 1 %iger Gallussäurelösung gemischt. Man schüttelt um und fügt 5 bis 10 Tropfen 10 %iger Natronlauge hinzu; dabei tritt eine rote bis weinrote Färbung ein, und allmählich fällt ein roter Niederschlag aus.

3. In einem Reagensglas versetzt man 10 ccm starke Strontiumchloridlösung (1 bis 10 %ig) mit 1 ccm 1 %iger Gallussäurelösung und 5 ccm Alkohol und fügt nach dem Umschütteln 1 ccm 10 %iger Natron- oder Kalilauge hinzu. Dabei entsteht ein dunkelblauer Niederschlag. Beim Stehenlassen geht die Farbe des Niederschlages in Schmutziggrün über und wird schließlich mißfarbig, während Barium mit Gallussäure längere Zeit hellblau bleibt (Unterschied von Calcium).

4. In einem Reagensglas werden 10 ccm $SrCl_2$-Lösung (1 bis 5 %ig) mit 1 ccm 1 %iger Gallussäurelösung versetzt. Nach dem Umschütteln fügt man 1 ccm Lauge hinzu, wobei ein grünblauer Niederschlag entsteht; beim Stehen wird er mißfarbig.

5. In einem Reagensglas mischt man 10 ccm starke Strontiumsalzlösung (1 %ig) mit 5 ccm Alkohol und 1 ccm 1 %iger Tanninlösung. Man schüttelt nun und fügt 10 Tropfen Lauge hinzu; dabei entsteht eine grüne Fällung. Wenn man hierbei 1 Teil starke Strontiumlösung mit 10 Teilen Alkohol mischt und 1 ccm 2 %iger Tanninlösung und Lauge hinzufügt und umschüttelt, so tritt eine sehr schöne rote Färbung ein. Mit Calcium erhält man auch erst eine orangerote Färbung, aber beim Stehenlassen geht sie in Gelb über. Mit Barium entsteht ein grüner Niederschlag (Unterschied von Calcium und Barium).

6. In einem Reagensglas versetzt man 5 ccm starke Strontiumsalzlösung (5 bis 10 %ig) mit 5 ccm absolutem Alkohol und einer Messerspitze Pyrogallol. Nach dem Umschütteln fügt man einige Tropfen Natronlauge hinzu und schüttelt kräftig durch, worauf eine vorübergehende dunkelblaue Färbung und Fällung eintritt (Unterschied von Calcium).

Barium.

1. In einem Reagensglas versetzt man 1 ccm 2 %iger frischer Tanninlösung mit 5 Tropfen 10 %iger Lauge, alsdann füllt man das Reagensglas mit einer 0,02 bis 0,05 %igen

Lösung von Bariumchlorid, wobei eine wiesengrüne Färbung eintritt. Wenn man hier eine stärkere Bariumsalzlösung benutzt, so fällt ein wiesengrüner Niederschlag aus.

2. In einem Reagensglas versetzt man 5 ccm verdünnte Bariumchloridlösung (0,2 bis 0,5 %ig) mit 10 ccm Alkohol und mit 2 bis 3 Tropfen 1 %iger Gallussäurelösung, alsdann fügt man 5 Tropfen Lauge hinzu; dabei tritt eine rotviolette Färbung und Fällung ein.

3. In einem Reagensglas werden 10 ccm starke Bariumchloridlösung (1 bis 10 %ig) mit 5 ccm Alkohol und 1 ccm 1 %iger Gallussäurelösung versetzt. Nach dem Umschütteln fügt man 1 ccm Natronlauge hinzu, wobei ein indigoblauer Niederschlag entsteht. Beim Stehenlassen geht die Farbe des Niederschlages in Hellblau über.

4. In einem Reagensglas werden 10 ccm einer 1 bis 5 %igen $BaCl_2$-Lösung mit 1 ccm 1 %iger Gallussäurelösung versetzt. Nach dem Umschütteln gibt man 1 ccm Lauge hinzu; dabei tritt ein blauer Niederschlag auf (Unterschied von Calcium).

5. Man mischt 10 ccm starke Bariumchloridlösung mit 5 ccm Alkohol und 1 ccm 1 %iger Tanninlösung. Nach dem Umschütteln setzt man 10 Tropfen Lauge hinzu und erhält dabei eine schmutzig-grüne Fällung.

6. In einem Reagensglas werden 5 ccm Bariumchloridlösung unter Kühlung mit 5 ccm absolutem Alkohol und mit einer Messerspitze Pyrogallol versetzt. Nach dem Umschütteln fügt man einige Tropfen Lauge hinzu, wobei eine blaue Fällung eintritt.

Übersichtstabelle.

Reagenzien	Reaktionen	Substanzen
1. 1 ccm 2 %ige frische Tanninlösung + 5 Tropfen 10 %ige KOH oder NaOH + 20 ccm sehr verdünnte Erdalkalisalzlösung (0,02 bis 0,05 %ig)	Erst blaue, dann grüne Färbung	Calcium
	Bläulich-grüne Färbung	Strontium
	Wiesengrüne Färbung	Barium
2. 5 ccm verdünnte (0,2 bis 0,5 %ige) Erdalkalisalzlösung + 10 ccm Alkohol + 2 bis 3 Tropfen 1 %ige Gallussäurelösung + 5 bis 10 Tropfen 10 %ige Lauge	Gelbrote Färbung, dann Niederschlag	Calcium
	Rote bis weinrote Färbung und Fällung	Strontium
	Rotviolette Färbung und Fällung	Barium

Übersichtstabelle (Fortsetzung).

Reagenzien	Reaktionen	Substanzen
3. 10 ccm starke Erdalkalisalzlösung (stärker als 1%) + 1 ccm 1%ige Gallussäurelösung + 5 ccm Alkohol + 1 ccm 10%ige Lauge	Dunkelblauer Niederschlag	Barium Strontium
	Rosaroter Niederschlag, beim Stehen langsam oberer Teil blau	Calcium
4. 10 ccm starke (1 bis 5%ige) Erdalkalilösung + 1 ccm 1%ige Gallussäure + 1 ccm Lauge	Schön blauer Niederschlag	Barium
	Bläulich-grüner Niederschlag	Strontium
	Rosa Niederschlag	Calcium
5. 10 ccm starke Erdalkalisalzlösung + 5 ccm Alkohol + 1 ccm 1%ige Tanninlösung + 10 Tropfen Lauge	Schmutzig-rosa Niederschlag	Calcium
	Schmutzig-grüner Niederschlag	Strontium Barium
6. 10 ccm Erdalkalisalzlösung (stärker als 0,5%) + 1 Messerspitze Pyrogallol + 5 bis 10 Tropfen Lauge (die mit metallischem Natrium[1]) hergestellt ist)	Eine vorübergehende intensive violette Färbung	Calcium
	Eine sehr schwache rötliche Violettfärbung; bei kräftigem Umschütteln dunkle Fällung	Strontium Barium
6a. 5 ccm 2 bis 5%ige Erdalkalisalzlösung + 1 Messerspitze Pyrogallol + 5 ccm Alkohol + 5 bis 10 Tropfen Lauge	Hellblaue Fällung	Barium
	Nach kräftigem Umschütteln dunkelblaue Färbung und Fällung	Strontium
	Eine mit Alkohol allein entstehende violette Färbung zeigt kein Calcium an[2])	

Nachweis von Calcium neben Strontium und Barium.

Man bereitet zuerst eine 2%ige Lösung der zu untersuchenden Erdalkalien.

1. Man nimmt 10 ccm von der Lösung, versetzt sie mit einer Messerspitze Pyrogallol und fügt alsdann einige Tropfen Natronlauge hinzu; dabei tritt eine intensive violette Färbung ein, welche die Anwesenheit von Calcium anzeigt.

2. In einem Reagensglas versetzt man 10 ccm Erdalkalilösung mit 5 ccm Alkohol und 10 Tropfen 1%iger Gallussäurelösung, dann fügt man einige Tropfen Lauge hinzu, wo-

[1]) Gewöhnliche Lauge enthält Calcium.

[2]) O. Schewket, diese Zeitschr. 54, 283, 1913. Das Reagens gibt mit Alkohol für sich eine violette Nuance, ohne daß Calcium zugegen ist.

bei eine rosarote Fällung und allmählich eine blaue Färbung entsteht. Erstere zeigt auch Calcium an.

Nachweis von Strontium neben Barium.

Bei Abwesenheit von Calcium kann man neben Barium Strontium nachweisen. Zu diesem Zweck muß man die Substanzen zunächst in Sulfate überführen. Nach dem Auswaschen der schwefelsauren Salze nimmt man etwas von dem weißen Niederschlag, suspendiert ihn in destilliertem Wasser und schüttelt kräftig um und filtriert. Man nimmt 10 ccm vom klaren Filtrat, versetzt mit einer Messerspitze Tannin und fügt nach dem Umschütteln einige Tropfen Lauge hinzu. Die dann auftretende vergängliche wiesengrüne Färbung zeigt die Anwesenheit von Strontium an, das im Gegensatz zum $BaSO_4$ in Wasser hinreichend löslich ist. Falls alle drei Erdalkalien zusammen vorhanden sind, muß man nach der von Treadwell empfohlenen Methode zuerst die Substanzen in Nitrate verwandeln und mit absolutem Alkohol alles Calciumnitrat entfernen. Dann muß man den Rückstand mit Ammoniumchlorid glühen und nochmals mit absolutem Alkohol behandeln. Jetzt löst sich Strontiumchlorid auf; der unlösliche Teil kann Bariumchlorid sein, das sich dann in destilliertem Wasser lösen muß. In den so erhaltenen Lösungen können nunmehr die Erdalkalien mit obigen Reagenzien einzeln nachgewiesen werden.

Versuche über hämolysehemmende Eigenschaften des Cholesterins und Oxycholesterins.

Von

E. Schreiber und Lénard.

(Aus dem Laboratorium der inneren Abteilung des Krankenhauses Magdeburg-Sudenburg.)

(Eingegangen am 17. Juli 1913.)

Bevor wir unsere Versuche über die therapeutische Verwendung des sog. Oxycholesterins fortsetzten, erschien es uns wünschenswert, zunächst einmal festzustellen, ob auch das Oxycholesterin wie das Cholesterin imstande ist, Saponin- und Kobragifthämolyse zu hemmen. Die Versuchsanordnung war dieselbe, die Hausmann gewählt hat[1]). Es wurden zu je 5 ccm einer 0,1 % igen Lösung von Saponin in physiologischer Kochsalzlösung 5 ccm Äther zugesetzt, in denen fallende Mengen des Oxycholesterins gelöst waren. Diese Mischung wurde kräftig durchgeschüttelt, blieb zunächst ca. 7 Stunden bei 40° stehen und über Nacht noch bei 30°. Der Äther wurde schließlich verdunstet. Von dieser Lösung wurden dann je 1 resp. 3 ccm einer 5 % igen Aufschwemmung von Kaninchenblutkörperchen zugefügt. Die Röhrchen mit 1 ccm wurden mit physiologischer Kochsalzlösung auf 8 ccm aufgefüllt. Das Gemisch blieb bei Zimmertemperatur stehen und wurde von Zeit zu Zeit bezüglich der Hämolyse abgelesen.

Da sich aber herausstellte, daß die Ätherlösung mit dem Saponin keine rechte Emulsion bildete, sind wir bei der Fort-

---

[1]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 6, 570.

setzung der Versuche so verfahren, daß wir das Oxycholesterin und Cholesterin in Methylalkohol gelöst der Saponinlösung zusetzten. Mit dieser Methylalkohollösung erhält man eine sehr schöne Emulsion, und damit wird die Methode naturgemäß exakter. Auch diese Lösung blieb ebensolange in der oben angegebenen Wärme stehen. Selbstverständlich haben wir uns vor diesen Versuchen davon überzeugt, daß an sich das Oxycholesterin und Cholesterin das Saponin in den Mengen nicht löst. Vom Methylalkohol war höchstens $^1/_2$ ccm zur Lösung des Oxycholesterins erforderlich; diese Menge hatte keinen Einfluß auf die Hämolyse, zur Lösung des Cholesterins ist eine etwas größere erforderlich, aber auch diese war ohne Einwirkung.

Es kam darauf an, Oxycholesterin zu verwenden, das absolut frei von Cholesterin war; eine Trennung dieser beiden ist aber durchaus nicht sehr leicht. Wir sind schließlich dazu übergegangen, das durch wiederholte Aufnahme mit Methylalkohol und unter Zusatz von Wasser möglichst gereinigte[1]) Oxycholesterin von den letzten Resten des Cholesterins mit Digitonin nach Windaus zu befreien. Man erhält dadurch, zumal wenn man nicht nachwäscht, wie wir uns mittels der kombinierten Cholesterinmethode überzeugen konnten, einen absolut cholesterinfreien Körper. Wacker[2]) konnte zeigen, daß das Cholesterin-Digitonin in Alkohol und Äther nicht absolut unlöslich ist, deshalb unterblieb das Nachwaschen. Wir werden auf diese Tatsache, da sie uns für die quantitative Trennung und Bestimmung der Körper mit Hilfe der Authenriethschen Methode[3]) wichtig erscheint, an anderer Stelle zurückkommen.

Die mit diesem gereinigten Oxycholesterin angestellten Versuche ergaben nun, daß es nur in höheren Konzentrationen fähig ist, die Hämolyse zu hindern, und in der Beziehung zweifellos dem Cholesterin ganz erheblich nachsteht. Wir geben hier beifolgend zwei derartige Versuche wieder:

---

[1]) Diese Zeitschr. 48, 373.

[2]) Zeitschr. f. phys. Chem. 80; Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 71, 376.

[3]) Münch. med. Wochenschr. Nr. 23, S. 1243.

I.

Dosis	Flüssigkeitsmenge ccm	Sofort	Nach 20 Stunden
		Oxycholesterin.	
0,01	3	Hemmung	etwas Lösung
0,01	1	do.	Spur Nachlösung
0,005	3	fast kompl. Hemmung	fast kompl. Lösung
0,005	1	do.	etwas Nachlösung
0,0025	3	Lösung	Lösung
0,0025	1	fast kompl. Lösung, kleine Kuppe	nahezu kompl. Lösung
		Cholesterin.	
0,01	3	Hemmung	Hemmung
0,01	1	do.	do.
0,005	3	do.	do.
0,005	1	do.	do.
0,0025	3	do.	do.
0,0025	1	do.	do.

II.

Dosis	Flüssigkeitsmenge ccm	Nach 1/4 Stunde	Nach 24 Stunden
		Cholesterin.	
0,01	3	schwache Hemmung	schwache Hemmung
0,01	1	Hemmung	Hemmung
0,005	3	fast kompl. Lösung	fast kompl. Lösung
0,005	1	Spur Lösung	Lösung
0,0025	3	kompl. Lösung	do.
0,0025	1	fast kompl. Lösung	do.
		Oxycholesterin.	
0,01	3	schwache Hemmung	fast kompl. Lösung
0,01	1	kompl. Hemmung	etwas Lösung
0,005	3	kompl. Lösung	Lösung
0,005	1	schw.Lösg., großeKuppe	do.
0,0025	3	kompl. Lösung	do.
0,0025	1	do.	do.

Dagegen ändert sich das Verhalten sofort, wenn dem Cholesterin etwas Oxycholesterin beigemischt ist. Es hemmt dann dieses Oxycholesteringemisch nicht nur stärker als das reine Oxycholesterin, sondern auch stärker als Cholesterin allein in der gleichen Menge.

III.

Cholesterin.

Dosis	Flüssigkeitsmenge ccm	Nach $^1/_4$ Stunde	Nach 24 Stunden
0,005	1	Hemmung	absolute Hemmung
0,005	3	do.	etwas Lösung
0,0025	1	do.	do.
0,0025	3	—	Lösung, Spur Hemmung
0,00125	1	beginnende Lösung	Lösung
0,00125	3	do.	do.
0,000625	1	Lösung	do.
0,000625	3	do.	do.

Cholesterin-Oxycholesterin.

Dosis Chol. Oxych.	Flüssigkeitsmenge ccm	Sofort	Nach 24 Stunden
0,005 +0,0011	1	Hemmung	Hemmung
0,0025 +0,0011	3	do.	do.
0,00125 +0,0011	1	do.	do.
0,000625+0,0011	3	do.	Spur Nachlösung

Der Versuch zeigt auch, daß der Zusatz von Oxycholesterin bis auf ganz geringe Mengen herabgedrückt werden kann, um doch das Cholesterin als solches für die Hämolysehemmung geeigneter zu machen. Stellt man dann einen Vergleichsversuch mit dem Unverseifbaren aus dem Blut an, so erhält man das beachtenswerte Resultat, daß ein solches Oxycholesterin-Cholesteringemisch ebenso stark hemmt wie das Unverseifbare aus dem Blut, und beide besser als die gleichen Mengen Cholesterin, wie z. B. die folgende Tabelle zeigt. In diesem Falle enthielt das Gemisch 30% Cholesterin.

Dosis	Flüssigkeitsmenge ccm	Sofort	Nach 24 Stunden
		Cholesterin.	
0,0005	1	Lösung	—
0,0005	3	do.	—
0,003	1	do.	—
0,003	3	do.	—
0,02	1	Hemmung	vollkommene Hemmung
0,02	3	do.	do.

Dosis	Flüssigkeitsmenge ccm	Sofort	Nach 24 Stunden
		Künstliches Cholesterin-Oxycholesteringemisch.	
0,0005	1	Hemmung	keine kompl. Lösung
0,0005	3	do.	do.
0,001	1	keine deutliche Lösung	do.
0,001	3	beginnende Lösung	do.
0,02	1	Hemmung	vollkommene Hemmung
0,02	3	do.	do.
		Unverseifbares des Blutes.	
0,0005	1	Lösung	—
0,0005	$2^1/_2$	do.	—
0,0025	1	Hemmung	keine kompl. Lösung
0,0025	3	do.	do.
0,025	1	do.	vollkommene Hemmung
0,025	1	do.	do.

Daß die Resultate in den einzelnen Versuchsreihen gegeneinander nicht ganz gleich ausfallen, liegt zweifellos an der Verschiedenheit der Blutkörperchen. Versuche mit Blutkörperchen anderer Tiere lieferten immer Ergebnisse in demselben Sinne wie in den angeführten Versuchen.

Anders verhielten sich aber unsere Resultate bei der Kobrahämolyse. Die Untersuchungen wurden nach der von Kahn[1]) verwandten Methodik angestellt, selbstverständlich unter den üblichen Kontrollen. In diesen Versuchen tritt kein deutlicher Einfluß des Oxycholesterins zutage, weder bei Verwendung von Kaninchenblutkörperchen noch von Pferdeblutkörperchen. Wir führen von verschiedenen derartigen, immer das gleiche Ergebnis liefernden Untersuchungsreihen hier nur eine an:

Dosis	Flüssigkeitsmenge ccm	Sofort	Nach 24 Stunden
		Cholesterin.	
0,005	1	schwache Hemmung	schwache Hemmung
0,001	1	fast kompl. Lösung	kompl. Lösung
0,0005	1	kompl. Lösung	do.
		Oxycholesterin.	
0,005	1	kompl. Hemmung	fast kompl. Hemmung
0,001	1	fast kompl. Lösung	fast kompl. Lösung
0,0005	1	kompl. Lösung	kompl. Lösung

[1]) J. Kahn, Einige Versuche über die Kobragifthämolyse und die praktische Bedeutung der Kobrareaktion. Med. Dissert. Göttingen 1911.

Aus den oben angeführten Versuchen geht aber auch weiter hervor, daß es wünschenswert ist, die einzelnen Stoffe des Unverseifbaren aus dem Blut nicht nur für sich allein bezüglich ihrer hämolysehemmenden, entgiftenden usw. Eigenschaften zu untersuchen, sondern, wenn man Schlüsse für die Klinik ziehen will, auch ihr Gemisch zu prüfen. Die letzten Untersuchungen von Stuber[1]) zeigen ja ebenfalls, daß die Gemische derartiger Stoffe anders wirken als die einzelnen Stoffe allein. Aus diesem Grunde dürfte es sich empfehlen, dem gesamten Unverseifbaren mehr Aufmerksamkeit zu widmen, als ihm bisher geschenkt worden ist. Es ist zu erwarten, daß gerade durch die Untersuchungen des gesamten Unverseifbaren bei den verschiedenen Erkrankungsformen noch mancherlei Aufschluß gewonnen werden kann.

Wenn man sich nun die Frage vorlegt, wie man die befördernde Wirkung selbst kleiner Mengen von Oxycholesterin auf die hämolysehemmenden Eigenschaften des Cholesterins erklären soll, so glaube ich, könnte man schon vom rein physikalisch-chemischen Standpunkt aus die Sache dahin deuten, daß der kleine Zusatz von Oxycholesterin eine weit bessere Emulsion gibt als Cholesterin in Methylalkohol und Kochsalzlösung allein. Wir haben auf diese Tatsache schon in unserer Arbeit[2]) hingewiesen, und es ist nicht unwahrscheinlich, daß das Oxycholesterin im Blut ebenfalls zur besseren Emulsion des Cholesterins resp. zu dessen Lösung beiträgt und dort die schützende Wirkung des Cholesterins unterstützt. Selbstverständlich wollen wir dadurch nicht ohne weiteres von der Hand weisen, daß dabei auch chemische Prozesse eine Rolle spielen, vielmehr ist das sogar wahrscheinlich. Wir wollten aber nicht verfehlt haben, auf diese physikalische Möglichkeit hinzuweisen.

Für die Fortsetzung mancher derartiger Versuche würde man es nicht nötig haben, sich der Mühe einer Reinigung des Oxycholesterins zu unterziehen, sondern es nach dem von Lifschütz[3]) angegebenen Verfahren darstellen und mit dem unreinen Oxycholesterin, dessen Cholesteringehalt man durch die Windaussche Methode feststellen kann, arbeiten.

---

[1]) Diese Zeitschr. **31**, S. 211.

[2]) Diese Zeitschr. **49**, 465; vgl. dazu auch Flury, Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **66**, 221.

[3]) Diese Zeitschr. **48**, 373.

Untersuchungen über die Löslichkeit der Harnsäure in Essigsäure.

Von

Francesco Rossi

mitgeteilt von

Vittorio Scaffidi.

(Aus dem Laboratorium des italienischen Hospitals in Buenos Aires.[1])

(Eingegangen am 17. Juli 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

Die eingehenden Versuche von His und Paul[2]) ergaben eine geringere Löslichkeit der Harnsäure als die von den früheren Autoren angegebene: während nämlich der Harnsäure eine Löslichkeit in Wasser zugeschrieben wurde, die zwischen 1 : 15000 und 1 : 17000 schwankte (Beusch, Behrend und Rosen, Blarez und Denigès, Nicolaier) bei einer Temperatur von 18 bis 20°, stellten His und Paul eine Löslichkeit — bei 18° — von 1 : 39480 auf.

Die Versuche von His und Paul[3]) bewiesen ferner, daß die Harnsäure in Lösungen von Schwefelsäure und Salzsäure weniger löslich ist als in Wasser, ganz übereinstimmend mit der Theorie von der elektrolytischen Dissoziation. Das theoretische Verhältnis zwischen der Löslichkeit in Wasser und derjenigen in 1n-Schwefel- und Salzsäurelösungen wurde durch die experimentellen Ergebnisse der Autoren vollkommen bestätigt, denn diese erzielten eine Löslichkeit von 1 : 42430 für die Salzsäure und von 1 : 44140 für die Schwefelsäure, was in befriedigendem Maße dem theoretischen Wert von 1 : 43620 ent-

---

[1]) Geleitet von V. Scaffidi.

[2]) His und Paul, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 1, 1900.

[3]) His und Paul, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 64, 1900.

spricht, besonders wenn man die unvermeidlichen Irrtümer bei derartigen Forschungen berücksichtigt, die eine ganz genaue Technik erfordern.

Die folgenden Untersuchungen betreffen das Studium des Koeffizienten der Löslichkeit der Harnsäure in Essigsäure im Verhältnis zur Temperatur und Konzentration des Lösungsmittels.

Die Essigsäure wurde in wässeriger Lösung verschiedener Konzentration angewandt, ausgehend von der $^{n}/_{100}$-Lösung bis zum Eisessig, entsprechend einer Konzentration 14n bis 16n. Das bei den Versuchen verwandte Wasser war zweimal destilliert und von der Kohlensäure durch eine 24stündige Leitung über einen durch Schwefelsäure und Ätzkali filtrierten Luftstrom befreit. Die angewandten Rezipienten waren aus Jena-Glas und vorher mit Wasserdampf gewaschen. Die Essigsäure wurde unserem Laboratorium von der Firma Merck geliefert.

Die bei den Versuchen befolgte Technik war verschieden, je nach der Temperatur, bei der sie vorgenommen wurden.

Löslichkeit der Harnsäure bei 15°.

Für diese Versuche wie auch für die bei 26° wurde der von Kernot und D'Agostino[1]) angegebene Apparat gebraucht, der aus einem großen Metallbad besteht, mit 20 bis 30 l Wasser; in der Mitte desselben befindet sich eine Achse mit strahlenförmiger Anordnung von 12 Haltern in Serien von je 6 Stück. An den 6 Haltern der unteren Serie werden 6 Glaskolben von 500 ccm Rauminhalt angebracht und mit einem Pfropfen verschlossen, durch den eine etwa 7 cm lange Glasröhre, an beiden Enden abgezogen, hindurchgeht. Diese Glasröhre hat am oberen Ende einen weiteren Pfropfen, den sie der ganzen Länge nach durchschneidet, um in einen anderen Kolben zu münden, der daran befestigt ist. Man erhält auf diese Weise ein geschlossenes System, das aus den beiden Kolben gebildet wird, die durch die Glasröhre untereinander in Verbindung stehen. Die Kolben der oberen Serie werden in den Haltern der oberen Lage befestigt und bleiben außerhalb des Wassers im Becken, in dem nur die Glaskolben der unteren Serie unter Wasser stehen.

Die Versuche verlaufen in folgender Weise:

In die unteren Glaskolben gibt man eine bestimmte Menge Harnsäure, die genau gewogen wurde, und fügt eine gewisse Menge des Lösungsmittels hinzu, und zwar in einem geringeren Verhältnis, aber ausreichend, um die ganze Harnsäure aufzulösen. In die oberen Glaskolben füllt

[1]) Kernot, D'Agostino und Pellegrino, Sulle influenze di solubilità. Atti R. Acc. Sc. fis. e mat. di Napoli 13, Nr. 15, 1907.

man weitere Lösungsflüssigkeit und befestigt das System an den an der Achse befindlichen Haltern, die sich in der Mitte des Thermostaten befindet und die man durch eine kleine Turbine oder einen anderen Motor in eine hin und her gehende Bewegung versetzt; diese vollzieht sich in einem Flächenraum von 45°. Der in Bewegung befindliche Apparat verursacht ein fortwährendes Schütteln der Flüssigkeit und der Harnsäure in dem Glaskolben bis zur Sättigung der in dem unteren Kolben befindlichen Flüssigkeit, die die Harnsäure enthält. Das Wasser des Thermostaten kann man mit Methylenblau leicht färben, und man erzielt dadurch eine genaue Schätzung der nicht aufgelösten Harnsäure, die sich am Boden des Kolbens festsetzt, sobald das Schütteln für kurze Zeit unterbrochen wird. Eine am Boden des Bades angebrachte elektrische Lampe erleichtert diese Abschätzung. Nach einer etwa 2 Stunden dauernden Bewegung beginnt man, neue Flüssigkeit hinzuzufügen, unter Erwärmung des oberen Kolbens und Ablassen kleiner Mengen der Lösungsflüssigkeit, die gegen das Ende des Versuchs nur noch tropfenweise erfolgt, bis die ganze Harnsäure gelöst ist. Alsdann unterbricht man die Bewegung, trocknet den Kolben mit der Harnsäure und wiegt ihn bis auf Zentigramme auf einer geeigneten Wage. Nachdem man das bereits festgestellte Gewicht des leeren Kolbens und der darin enthaltenen Harnsäure kennt, berechnet man den Koeffizienten der Löslichkeit.

Tabelle.

Konzentrationsgrad der Essigsäure	Harnsäure, gelöst in 100 ccm der Lösungsflüssigkeit, in Gramm					1 g Harnsäure wird in ccm der Lösungsflüssigkeit gelöst				
	15°	26°	50°	75°	Siedetemperatur	15°	26°	50°	75°	Siedetemperatur
n/100	0,0024	0,0048	0,0124	0,0292	0,0770	42500	20833	8064	3424	1428
n/50	—	0,0048	0,0132	0,0300	0,0770	—	20833	7575	3333	1428
n/10	0,0028	0,0052	0,0128	0,0304	0,0763	39285	19230	7812	3256	1310
n/2	0,0032	0,0092	—	0,0344	—	31562	10869	—	2906	—
1 n	0,0032	0,0108	0,0156	0,0424	0,1102	31562	9259	6410	2358	907
2 n	0,0048	0,0116	0,0168	0,0520	—	20833	8620	5952	1923	—
3 n	0,0060	0,0108	—	—	—	16666	9259	—	—	—
4 n	0,0072	0,0124	0,0216	0,0622	0,1124	13888	8065	4629	1607	889
6 n	0,0060	0,0128	0,0220	0,0728	—	16668	7828	4536	1373	—
8 n	0,0064	0,0128	0,0212	—	0,0959	15625	7828	4716	—	1042
10 n	0,0064	0,0120	0,0184	0,0692	0,0742	15625	8333	5434	1430	1347
12 n	0,0056	—	0,0196	0,0480	0,0513	17892	—	5102	2083	1949
14 n	0,0056	0,0100	0,0148	0,0304	—	17892	10000	6756	3256	—
15 n	0,0052	—	0,0152	0,0236	—	19230	—	6410	4233	—
16 n	—	0,0084	—	—	0,0091	—	11904	—	—	1098
H_2O	0,0028	0,0040	0,0144	0,0304	0,0789	35714	25000	8620	3256	1262

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, entspricht der Koeffizient der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser bei einer Tem-

peratur von $15^0 = 1:35714$; derselbe nähert sich also sehr demjenigen, den His und Paul gefunden haben.

Die Essigsäure, in den Konzentrationen von $^n/_{100}$ bis $^n/_{10}$, bildet ein geringeres Lösungsmittel als das destillierte Wasser; während bei stärkeren Konzentrationen die Löslichkeit der Harnsäure progressiv zunimmt, um ein Maximum in 4n-Essigsäure zu erreichen, in der der Koeffizient der Löslichkeit 1:13888 entspricht; für stärkere Konzentrationen geht daher die Löslichkeit der Harnsäure bis 1:19230 in 15n-Essigsäure zurück.

Löslichkeit der Harnsäure bei 26°.

Die angewandte Technik ist die gleiche wie für die Auflösung bei 15°.

Aus den Ergebnissen, wie sie die Tabelle zeigt, geht hervor:

1. Der Koeffizient der Löslichkeit der Harnsäure in destilliertem Wasser ist gleich 1:25000.

2. Der Koeffizient der Löslichkeit in Essigsäure ist gleich 1:20800 bei Konzentrationen innerhalb $^n/_{100}$ und $^n/_{10}$; er erhöht sich somit progressiv bis zur Erreichung des Verhältnisses von 1:7828 für eine Konzentration von 6n und vermindert sich bis zum Verhältnis von 1:11900 bei der Höchstkonzentration von 16n, die der Konzentration der angewandten Eisessigsäure entspricht.

Löslichkeit der Harnsäure bei 50 und 75°.

Für diese Versuche wurde eine abweichende Technik befolgt von derjenigen, die zu den Versuchen bei 15 und 26° gebraucht wurde. Eine Menge Harnsäure, die unbestimmt ist, aber jedenfalls die Menge des angewandten Lösungsmittels übersteigt, wurde in einen Jena-Glaskolben gebracht, in dem sich etwa 300 ccm der erwähnten Lösung von Essigsäure befand. Sie wurde etwa 2 Stunden auf dieselbe Weise geschüttelt wie in dem Thermostaten der vorher beschriebenen Versuche, alsdann wurde die Flüssigkeit einige Minuten ruhen lassen. Ein Teil der Flüssigkeit wurde dann durch ein doppeltes Filter, das auf die gleiche Temperatur wie die Flüssigkeit gebracht wurde, filtriert und in einen Glaskolben geleitet, der ebenfalls in ein Bad von 50 oder 75° gebracht war; von der filtrierten Flüssigkeit wurden 100 ccm mit einer kalibrierten Pipette herausgenommen und auch diese letztere im Thermostaten auf einer Temperatur von 50 oder 75° gehalten; die Flüssigkeit wurde sofort in eine Platinschale gegossen. Alsdann ließ man sie im Ofen verdampfen bis zum Eintrocknen bei 100 bis 110°; der Rückstand wurde gewogen. Die Resultate sind in der Tabelle angegeben.

Der Koeffizient der Löslichkeit der Harnsäure in Essigsäure zeigt bei der Temperatur von 50 und 75° dieselben Modalitäten wie bei den geringeren Temperaturen.

Bei 50° weicht die Löslichkeit der Harnsäure in Essigsäure schwacher Konzentration wenig von der Löslichkeit in destilliertem Wasser ab: das Verhältnis ist 1:8620 für destilliertes Wasser, während sie für $^{n}/_{100}$ bis $^{n}/_{10}$-Essigsäure zwischen 1:8064 und 1:7812 variiert.

Der Koeffizient der Löslichkeit erhöht sich infolgedessen bis zum Maximum von 1:4536 bis 1:4716 für Konzentrationen von 4n bis 8n-Essigsäure und geht alsdann zurück in stärkeren Konzentrationen bis zu einem Verhältnis von 1:6756 in 14n-Essigsäure.

Bei der Temperatur von 75° ergibt sich ein Löslichkeitskoeffizient der Harnsäure in Wasser von 1:3256; für Konzentrationen von $^{n}/_{100}$ bis $^{n}/_{10}$-Essigsäure schwankt er zwischen 3256 und 3424; bei stärkeren Konzentrationen erhöht sich die Löslichkeit bis maximal 1:1373 bis 1:1430 in 6n- bis 8n-Lösungen; sie nimmt alsdann ab für die Lösungen von Essigsäure stärkerer Konzentration bis zu 1:4233 in 15n-Essigsäure.

Die Löslichkeit bei Siedetemperatur.

Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt:

In Jena-Glaskolben wurden bestimmte Mengen genau gewogener Harnsäure gebracht und Essigsäure in geringerer Menge hinzugefügt, als für die Auflösung der im Kolben befindlichen Harnsäure nötig war; auf dieselben wurde ein Kühler angebracht, durch den ein schneller Strom kalten Wassers hindurchlief. Die Glaskolben wurden auf einem Bade von schwarzem Sand zum Sieden gebracht, auf dem sich die Harnsäure deutlich erkennbar abhob. Nachdem die Flüssigkeit eine halbe Stunde gekocht hatte, wurde durch eine innere Röhre des Kühlers frische Lösung von Essigsäure in die Glaskolben eingeführt und deren Aspiration mit Hilfe der Abkühlung eines nassen Tuches angeregt. Die Zuführung kleiner Mengen Essigsäure wurde mehrmals wiederholt in Zwischenräumen von 5 bis 10 Minuten, bis die Harnsäure vollständig aufgelöst war.

Die Feststellungen wurden fast alle wiederholt wie diejenigen bei niedrigeren Temperaturen, und die in der Tabelle mitgeteilten Daten bilden den Durchschnitt von zwei oder drei Bestimmungen.

Die Ergebnisse stimmen, im allgemeinen, mit denen bei Versuchen mit niedrigeren Temperaturen überein.

In destilliertem Wasser erzielt man einen Löslichkeitskoeffizienten gleich 1 : 1262; in ganz schwachen Lösungen von Essigsäure war das Verhältnis von 1 : 1428 bis 1 : 1310; bei stärkeren Lösungen von 4n-Essigsäure erhöht sich der Löslichkeitskoeffizient bis zu 1 : 889; alsdann zeigt sich eine progressive Abnahme bis zur Konzentration von 12n; also ein ganz starker Rückgang, wenn die Konzentration des Lösungsmittels höchstens 16n ist.

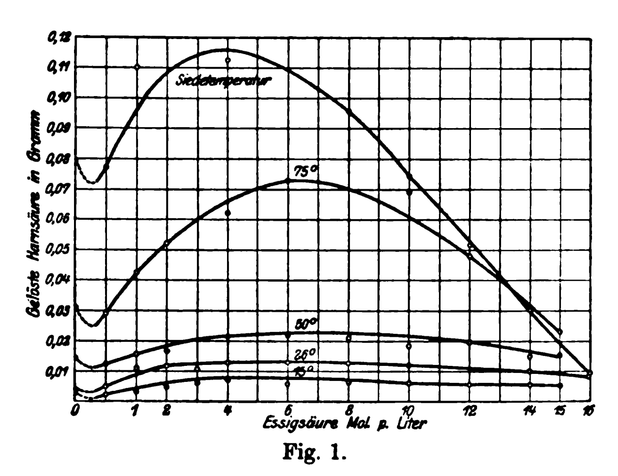


Fig. 1.

Zum Verständnis der in der Tabelle mitgeteilten Daten und der betreffenden Kurven kann man, in Anbetracht der erhöhten Löslichkeit der Harnsäure in konzentrierten Lösungen von Essigsäure, zu folgenden zwei Hypothesen gelangen:

1. daß es sich um eine einfache Beeinflussung der Löslichkeit handelt, ohne daß bei den gelösten Substanzen irgendwelche Reaktion eintritt;

2. daß es sich um eine echte und wirkliche chemische Reaktion zwischen den beiden gelösten Substanzen handelt, mit Bildung einer dritten, ziemlich lösbaren Substanz.

Es scheint uns, daß gegen die erste Hypothese die Tatsache spricht, daß erhöhte Löslichkeit ohne chemische Reaktion vorhanden ist, wenn die beiden miteinander in Verbindung gebrachten Substanzen kein gemeinschaftliches Ion haben, wie es z. B. bei $BaCO_3$ und NH_4Cl vorkommt, während im Falle der Essigsäure und der Harnsäure ein gemeinsames Ion ($H^{\cdot}$) besteht.

Aus vorstehenden Versuchen geht daher hervor, daß, während die schwachen Konzentrationen von Essigsäure eine hemmende Wirkung auf die Löslichkeit der Harnsäure ausüben, diese Löslichkeit übermäßig wird bei stärkeren Konzentrationen und wiederum herabgesetzt wird bei ganz starken Konzentrationen.

Bei den Kurven, die die Löslichkeitsverhältnisse graphisch darstellen, sind die äußersten Grenzen punktiert, um anzudeuten, daß diese Angaben nur wahrscheinlich sind.

Wenn man die Versuchsirrtümer abrechnet, die bei derartigen Untersuchungen unvermeidlich sind, so darf man annehmen, daß in $^{n}/_{100}$ bis $^{n}/_{10}$-Essigsäure die Harnsäure in einem geringeren Verhältnis aufgelöst wird als in destilliertem Wasser, was aus den Versuchen bei 15° und bei 75° sowie bei Siedetemperatur hervorgeht.

In diesem Falle lassen gerade die physikalisch-chemischen Beziehungen eine Abnahme der Löslichkeit voraussehen, und in Mineralsäuren haben auch tatsächlich His und Paul diese Tatsache festgestellt.

Als mögliche Ursache der von uns gefundenen Tatsachen für hohe Konzentrationen von Essigsäure bleibt daher die Bildung einer dritten Substanz, die aus der Reaktion von Essigsäure und Harnsäure entsteht.

Man ersieht aus einem Vergleich der Löslichkeitskurven der Harnsäure, wie wir sie festgestellt haben, mit der Dissoziationskurve der Essigsäure bei 18°, die sich aus den von Kohlrausch[1]) gegebenen Daten ergibt, daß eine gewisse Beziehung zwischen dem absoluten Ionengehalt der Lösungen von Essigsäure (Maximum bei einer Konzentration 2n bis 4n) und der Löslichkeit der Harnsäure besteht, die gerade in den Essigsäurelösungen ein Maximum erreicht, in denen die Dissoziation eine hohe ist; dies legt daher den Gedanken nahe, daß die Bildung dieser neuen Substanz aus der Verbindung der Harnsäure mit Essigsäure in gewissem Sinne den tatsächlich vorhandenen Ionen proportional ist.

Jedenfalls bleibt die Art der neuen Substanz zweifelhaft in Ermangelung genügender experimenteller Daten; lediglich in hypothetischem Sinne kann man gelten lassen, daß es sich

---

[1]) Kohlrausch, Leitvermögen der Elektrolyte.

um ein Salz handelt, in dem die Harnsäure als Base auftritt, oder um eine Säure mit einem komplexen Harn-Essigsäure-Anion.

Es liegt in jedem Falle klar auf der Hand, daß uns die experimentellen Ergebnisse nicht die nötigen Stützen liefern, um irgendeine dieser Hypothesen anzunehmen, auf die wir mehr deshalb hinweisen wollen, um eine neue Reihe vorzunehmender Versuche anzudeuten, als die Frage mit einer endgültigen Erklärung abzuschließen.

Theorie des Haftdrucks und Lipoidtheorie.

Von

J. Traube.

(Aus der Technischen Hochschule zu Charlottenburg.)

(Eingegangen am 17. Juli 1913.)

In einer Reihe von Abhandlungen[1]) habe ich auf die Schwächen der osmotischen Theorie von van't Hoff und der Lipoidtheorie von H. Meyer und Overton hingewiesen und Gedanken entwickelt, die allmählich zu einer Theorie des Haftdrucks führten. Ich habe die Genugtuung, daß man sich in den Kreisen der Biologen — langsam — für meine diesbezüglichen Ideen zu interessieren beginnt, um so mehr als wohl allmählich immer mehr erkannt wird, daß die osmotische Theorie die großen Erwartungen, die man an sie stellte, zum weitaus größten Teil unerfüllt ließ und ebenso die Lipoidtheorie immer mehr ihre Unzulänglichkeit erweist, mögen auch ihre Verteidiger sich noch so viel bemühen, die Schwächen dieser Theorie nicht gelten zu lassen.

An anderer Stelle[2]) werde ich binnen kurzem Gelegenheit nehmen, noch einmal eingehend die Beziehungen und Abweichungen meiner und der osmotischen Theorie zu erörtern. Hier soll unter Bezugnahme auf meine früheren diesbezüglichen Erörterungen nur Gelegenheit genommen werden, meine Theorie mit derjenigen von Overton und Hans Meyer in Parallele zu stellen. Dieses dürfte um so weniger zwecklos sein, als Herr Höber, der eifrigste Verteidiger der Lipoidtheorie, an dieser Stelle[3]) vor kurzem in seiner Auseinandersetzung mit

---

[1]) Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **105**, 541 und 559, 1904; **123**, 419, 1908; **132**, 511, 1910; **140**, 109, 1912.

[2]) Siehe demnächst Arch. f. d. ges. Physiol.

[3]) Höber, diese Zeitschr. **50**, 418, 1913.

Ruhland für jene Theorie eine weitere Lanze gebrochen hat, und vor allem weil dieser Forscher in der 3. Auflage seines mit Recht weitverbreiteten Lehrbuches „Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe“ Gelegenheit nahm, meine Theorie der Osmose einer durchaus absprechenden Kritik zu unterziehen.

1. Theorie des Haftdrucks.

Nach Gibbs-Thomsons Prinzip werden in Wasser gelöste Stoffe in um so größerer Konzentration in der Oberfläche sich ansammeln, je mehr dieselben die Oberflächenspannung des Wassers vermindern. Daß dieses tatsächlich der Fall ist, folgt u. a. aus den Untersuchungen von Lewis[1]), der beispielsweise fand, daß die Oberfläche einer 0,25%igen wässerigen Lösung glykokollsauren Natriums nicht weniger als 40,3% dieses Salzes enthielt.

Man kann jenes thermodynamisch begründete Prinzip auch folgendermaßen aussprechen: Je mehr ein Stoff die Oberflächenspannung des Wassers vermindert, je capillaraktiver derselbe ist, um so geringer ist sein Haftdruck, um so leichter geht derselbe in die Oberfläche.

Ist nun die Oberfläche in Berührung mit Luft, so wird der betreffende in der Oberfläche konzentrierte Stoff eine um so größere Tendenz haben, die Oberfläche zu verlassen und in die Luftphase überzugehen, je größer sein Dampfdruck in Berührung mit Wasser ist. Die Dampfdrucke wässeriger Lösungen und Emulsionen capillaraktiver Stoffe stehen daher auch in innigsten Beziehungen zu den hier zu besprechenden osmotischen Problemen[2]), und namentlich für Stoffe, die in Wasser nur wenig löslich sind (wie flüchtige Kohlenwasserstoffe, Halogenalkyle), würde ihre Messung für die Probleme der Osmose und Narkose von um so größerer Bedeutung sein, als hier Messungen der Oberflächenspannung der wässerigen Lösung nach den üblichen Methoden kein Maß der Oberflächenkonzentration ergeben, da die Oberflächen-

[1]) Lewis, Zeitschr. f. physikal. Chem. 78, 129, 1910 und Phil. Mag 15 (6), 499, 1908 und 17, 466, 1909. Vgl. auch Mac Callum, Oberflächenspannung und Lebenserscheinungen. Ergebnisse der Physiologie von Asher und Spiro 11.

[2]) Vgl. Traube, Verhdl. d. Deutsch. physikal. Ges. 10, 901, 1908.

konzentration geringer ist, als sie sein würde, wenn der Stoff weniger flüchtig wäre[1]).

Ist nun die zweite Phase nicht Luft, sondern etwa eine homogene Flüssigkeit oder ein fester Stoff, so ist eine Tendenz jenes Stoffes, der sich in der Oberfläche der wässerigen Phase konzentriert hat, in die zweite Phase überzugehen, nur dann vorhanden, wenn die Lösungstension oder besser der Haftdruck in oder an der zweiten Phase hinreichend groß ist. Das ist natürlich keineswegs immer der Fall, denn wenn der Haftdruck in der wässerigen Phase sehr gering ist, so folgt daraus noch nicht, daß der Haftdruck in oder an der zweiten Phase sehr groß sein muß. Trotzdem besteht vielfach eine gewisse Reziprozität. Zunächst haben Stoffe, die sich in der Oberfläche konzentrieren, naturgemäß eine weit größere Chance von der zweiten Phase aufgenommen zu werden, als Stoffe mit großem Haftdrucke im Wasser, die aus der Oberfläche entfernt werden. Stehen auch Adsorption und Verteilung im allgemeinen keineswegs in einfacher reziproker Beziehung zur capillaren Aktivität und Oberflächenkonzentration in Wasser, da ja außer dem Haftdruck im Wasser noch ein zweiter Haftdruck in Betracht kommt, so ist doch der Haftdruck im Wasser ein Hauptfaktor.

So zeigte sich in einer früheren Abhandlung[2]), daß, wenn der durch die Oberflächenspannung gemessene Haftdruck eines Stoffes im Wasser größer war als ein gewisser Schwellenwert, ein Übergang desselben von Wasser in Benzol auch dann nicht oder äußerst wenig stattfand, wenn an sich der betreffende Stoff in Benzol leicht löslich war[3]) (beispielsweise Alkohol).

Wenn ein — echter — Farbstoff von einer Faser trotz

---

[1]) Zu diesen Stoffen gehört das Chloroform. Chloroformemulsionen (durch Vermischen von Chloralhydrat mit Natriumcarbonat) zeigen allerdings eine weitaus geringere Oberflächenspannung als Wasser, vgl. die Schlußbemerkung in meinem etwa gleichzeitig im Arch. f. d. ges. Physiol. erschienenen Aufsatz über Narkose.

[2]) Verhdl. d. Deutsch. physikal. Ges. **10**, 901, 1908.

[3]) In dem Systeme Toluol und Wasser geht Pikrinsäure trotz seiner größeren Löslichkeit in Toluol in verdünnten Lösungen völlig in das Wasser über, weil sein Haftdruck in diesem Lösungsmittel wesentlich größer ist als in Toluol. Das Gesetz von Henri gilt für solche Fälle nicht. Vgl. meine Ausführungen Kolloidchem. Beihefte **1912**, Über Oberflächenspannung usw. S. 334.

seiner Löslichkeit in Wasser durch dieses Lösungsmittel nicht heruntergewaschen werden kann, so liegt dies eben daran, daß der Haftdruck gegenüber der Faser ganz wesentlich größer ist als gegenüber dem Wasser.

Wenn nun eine wässerige Lösung etwa tierischen oder pflanzlichen Ursprungs, die u. a. Stoffe mit geringem Haftdrucke enthält, beispielsweise Narkotica, in Berührung ist mit einem Schwammwerk von Zellen, bestehend aus wässerigem Protoplasma und gelatinöser oder sonstiger fester Substanz — und wenn wir zunächst annehmen, daß dieses Schwammwerk keine Lipoide enthalte, so wird ein Stoff um so leichter und in um so größerer Menge in dieses heterogene Zellsystem eindringen, je geringer sein (durch Oberflächenspannungen oder Dampfdruckmessungen meßbarer) Haftdruck in der wässerigen Phase ist.

Soweit derselbe nun nicht von der festen oder gequollenen Substanz durch Adsorption, Bindung oder Lösung festgehalten wird, wird der Stoff in der wässerigen protoplasmatischen Flüssigkeit fortdiosmieren mit einer Geschwindigkeit, die von verschiedenen Einflüssen, wie Oberflächenspannung, Reibung und elektrischer Ladung abhängt. Die Größe der Adsorption hängt von der Natur des Stoffes und des Adsorbens ab — sie ist für capillaraktive aromatische, saure oder basische Stoffe besonders groß; in manchen Fällen ist sie (nach obigem) so groß, daß der betreffende Stoff an der Grenzfläche der Phasen völlig festgehalten wird, meist aber wird eine Verteilung stattfinden, die ein Fortdiosmieren ermöglicht.

Auf alle Fälle versteht man so ohne weiteres, daß **auch bei völliger Abwesenheit von Lipoiden** capillaraktive Stoffe, also Stoffe von geringem Haftdrucke, in Wasser (einwertige Alkohole, Äther, Ester, Ketone usw.) im allgemeinen ganz wesentlich leichter diosmieren müssen als Salze; man versteht ferner, daß auch die nicht lipoidlöslichen Nichtleiter, wie Rohrzucker, Mannit, Glycerin, Harnstoff usw., sich entsprechend ihrem Haftdruck und ihren osmotischen Fähigkeiten in ein und dieselbe ganz bestimmte Reihenfolge ordnen[1]), und daß ganz das gleiche gilt für die nicht

[1]) Vgl. Traube, Arch. f. d. ges. Physiol. **132**, 511, 1910 und **140**, 125, 1911.

lipoidlöslichen Salze, denn wenn beispielsweise Nitrationen im allgemeinen leicht, Chlorionen weniger leicht und Sulfationen nur schwierig in die meisten Zellen eindringen, so ist hierfür die Stellung in der Haftdruckreihe[1]) maßgebend.

Man versteht in überraschend einfacher Weise die mannigfaltigsten Versuchsergebnisse: So in erster Linie die in der Tat durch die vielseitigsten Untersuchungen[2]) (Plasmolyse, Hämolyse, Muskelquellung, Narkose, Osmose in Gerste usw.) festgestellte Tatsache, daß capillaraktive Stoffe entsprechend ihrem Haftdruck mit erheblichen Geschwindigkeiten — sehr häufig unter Mitreißen des Wassers, also unter Erzeugung von Quellung[3]) — in die Zellen eindringen, man versteht aber auch, ohne wie Herr Höber neben der „physikalischen" Permeabilität (Lipoidlöslicheit) noch eine auf etwas mystischen Ursachen beruhende „physiologische" Permeabilität annehmen zu müssen[4]), daß auch Salze und Zuckerarten in die Zellen einzudringen vermögen.

Wenn Warburg und Wiesel[5]) finden, daß die Reihenfolge und Wirkung der Narkotica in bezug auf die Verlangsamung der Hefegärung ganz dieselbe bleibt, auch wenn die Hefe durch Waschen mit Aceton und Äther ihres Lipoidgehalts beraubt ist, wenn Warburgs Schüler Usui[6]) findet, „daß die Entfernung der Lipoide aus dem Stroma der roten Blutkörperchen das Aufnahmevermögen für Thymol nicht erheblich vermindert", wenn sich gezeigt hat[7]), daß sich für die hemmende Wirkung der Narkotica auf zahlreiche Oxydationsvorgänge usw. der verschiedensten Art dieselbe Reihenfolge ergibt, gleich-

---

[1]) Siehe ebenda **132**, 511, 1910.

[2]) Traube, ebenda **132**, 511, 1910 und **140**, 109, 1912.

[3]) Osmotische Versuche, die zur Zeit in meinem Laboratorium von Dr. Marusawa über das Eindringen von Wasser und wässerigen Lösungen von Alkoholen, Estern, Äthern usw. in Pflanzensamen und in Kolloiden wie Stärke, Gelatine, Eiweiß usw. ausgeführt wurden, lassen keinen Zweifel, daß in zahlreichen Fällen die capillaraktiven Stoffe bei ihrem Eindringen auch das Wasser mitreißen.

[4]) Vgl. Höber, Physikal. Chem. d. Zelle u. Gewebe.

[5]) Warburg und Wiesel, Arch. f. d. ges. Physiol. **144**, 465, 1912.

[6]) Usui, Zeitschr. f. physiol. Chem. **81**, 176, 1912.

[7]) Siehe meine Arbeit über Narkose, die etwa gleichzeitig im Arch. f. d. ges. Physiol. erscheint.

gültig, ob es sich um physiologische Vorgänge handelt oder um die Oxydation von Natriumsulfit, Zinnchlorür usw. bei völliger Abwesenheit von Lipoiden, und wenn diese Reihenfolge nahezu zusammenfällt mit der Reihe der Oberflächenspannungen, dann wird man einsehen, daß schwerwiegende Gründe zugunsten der hier entwickelten Anschauungen geltend zu machen sind.

Aber mehr noch: die Beziehungen, welche die Oberflächenspannung mit Osmose, Narkose, Toxizität verbanden, erwiesen sich sogar von quantitativer Art.

Das einfache von mir aufgefundene Capillargesetz: wonach die Verminderung der Oberflächenspannungen des Wassers durch gleiche Molzahlen gelöster homologer capillaraktiver Stoffe (Alkohole, Ketone, Ester usw.) mit wachsendem Molekulargewicht im Verhältnis $1:3:3^2:3^3$ zunimmt, gilt für die Hämolyse (Fühner und Neubauer) und Plasmolyse (Vandevelde), die Narkose von Kaulquappen (Overton), die Entwicklungshemmung von Seeigeleiern (Fühner), die Hemmung von Oxydationsvorgängen (Vernon)[1], den Exomoseeintritt in Pflanzen (Czapek), die Keimfähigkeit der Hefe (Kisch), die Plasmaströmung in Pflanzen (H. Nothmann-Zuckerkandl) und endlich den auf Narkose beruhenden Übergang von Heliotropismus in Antiheliotropismus bei Crustaceen (Loeb)[2].

Und diese quantitativen Beziehungen sind nicht lediglich auf homologe Stoffe beschränkt.

Die Feststellungen Czapeks[3]) und seines Schülers Kisch[4]), wonach für die verschiedensten Alkohole, Äther, Ester, Ketone und Urethane, bei einem gleichen Schwellenwerte der Oberflächenspannung, die Pflanzenzellen zerstört wurden, bildet die vortrefflichste Bestätigung der hier entwickelten Anschauungen, und wenn wir für die Versuche an Tierzellen uns mit einer mehr qualitativen als quantitativen Übereinstimmung zwischen Oberflächenspannung und Osmose begnügen müssen, so liegt dies,

[1]) Vgl. meine diesbezüglichen Tabellen in obiger Narkosearbeit.

[2]) Vgl. die Literatur meiner Arbeiten, l. c. im Arch. f. d. ges. Physiol.

[3]) Czapek, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 28, 480, 1910.

[4]) Kisch, diese Zeitschr. 40, 151, 1912.

wie an anderen Orten näher ausgeführt wurde[1]), an dem Vorhandensein der größeren Lipoidmengen, welche bewirken, daß hier nicht lediglich die gemessene Oberflächenspannung : wässerige Lösung : Luft, sondern auch die weniger genau zu ermittelnde der wässerigen Lösung : Lipoid mit in Betracht kommt, ferner auch daran, daß der Alkaligehalt der Körpersäfte sowie die darin enthaltenen Salze die Oberflächenspannungen in nicht genau berechenbarer Weise ändern.

2. Die Lipoidtheorie.

Zu den Stoffen, welche die Oberflächenspannung des Wassers besonders stark erniedrigen, gehören insbesondere: einwertige Alkohole, Aldehyde, Ketone, Äther, Ester usw. Es sind dies Stoffe, die im allgemeinen leicht löslich in Lipoiden sind. Es besteht hiernach eine gewisse Reziprozität zwischen der Löslichkeit oder besser dem Haftdruck in Wasser und Lipoiden, welche die Beziehungen von Haftdrucktheorie und Lipoidtheorie verständlich erscheinen läßt. Bevor Hans Meyer und Overton ihre theoretischen Vorstellungen entwickelten, war von Richet[2]) die Ansicht ausgesprochen worden, daß eine Verbindung ein um so stärkeres Narkoticum sei, je geringer deren Löslichkeit in Wasser sei.

Diese Annahme von Richet ist zwar nicht ganz richtig, aber sie enthält einen verwandten Kern wie die Theorie des Haftdruckes, und Overtons derzeitige Kritik (siehe l. c.) war nicht berechtigt.

Wenn somit Lipoide in einer Zelle vorhanden sind, so unterliegt es keinem Zweifel, daß diese Stoffe an den osmotischen Vorgängen — soweit es sich um lipoidlösliche Stoffe handelt — beteiligt sind. Sie unterstützen — vielleicht[3]) — die Osmose,

---

[1]) Siehe meine demnächstigen Mitteilungen über Narkose usw., Arch. f. d. ges. Physiol. Übrigens, selbst in diesen Fällen, zeigt sich, daß für die meisten indifferenten Stoffe mit geringem Haftdrucke (Alkohole, Ketone, Äther usw.) das Produkt aus den Oberflächenspannungsverminderungen und den narkotischen, bzw. oxydationshemmenden, bzw. kolloidfällenden Konzentrationen in ziemlich engen Grenzen schwankt. Das ist fast mehr als man erwarten konnte.

[2]) Vgl. Overton, Narkose. Jena 1901, S. 45.

[3]) Ich sage: vielleicht, denn es will mir scheinen, daß die Lipoide eher die Osmose hemmen als beschleunigen, denn Stoffe mit

aber ihre Beteiligung an den osmotischen Vorgängen ist nur eine Begleiterscheinung und nicht der springende Punkt.

Der springende Punkt ist Gibbs-Thomsons Prinzip. Oxydations- und sonstige Vorgänge, deren Hemmung durch Narkotica die Quintessenz der Narkose bilden, werden[1]) gehemmt, auch wenn keine Spur von Lipoiden vorhanden ist; für die Hemmung der Gärfähigkeit der Hefe ist es nahezu gleichgültig, ob die Hefe ihres Lipoidgehalts beraubt wurde oder nicht (siehe oben), die Stromata roter Blutkörperchen adsorbieren fast die gleichen Mengen von Thymol nach Behandlung mit Aceton und Äther wie vorher, lipoidunlösliche Stoffe erlangen Einlaß in die Zellen wie lipoidlösliche, die Farbstofftheorie Overtons, nach welcher die Aufnahme der Farbstoffe in die Zellen durch ihre Lipoidlöslichkeit bedingt sein soll, hat nach den übereinstimmenden Ergebnissen von Ruhland[2]), Garmus[3]) und Schulemann[4]) Schiffbruch erlitten, und vergeblich bemüht sich Herr Höber[5]), die in dieser Beziehung berechtigten Einwände insbesondere Ruhlands zu entkräften. Das alles und vieles andere sind Gründe genug, um zu zeigen, daß die Lipoidtheorie nicht genügt, um alle Erscheinungen der Osmose und Narkose zu erklären, und man muß sich fast wundern, daß Forscher wie Warburg, Czapek, Fühner u. a., die selbst das Material herbeigeschafft haben, um die Mängel der Lipoidtheorie zu beleuchten, so zähe an derselben festhalten. Wären nicht die mannigfaltigen Be-

---

sehr großem Haftdruck in Lipoiden werden einfach — sofern sie sich darin lösen sollten — von den Lipoiden festgehalten und nicht wieder losgelassen (siehe meine Ausführungen über Henris Gesetz). Die Lipoide werden aber durch capillaraktive Stoffe entsprechend deren Haftdruck am Wasser geflockt. Da sie die Oxydationen befördern (siehe Warburg und Meyerhof, Arch. f. d. ges. Physiol. **148**, 296, 1912), so wird durch die Flockung ihre fermentative Mitwirkung bei der Narkose gehemmt. Die Lipoidfällbarkeit spielt also eine größere Rolle als die Lipoidlöslichkeit.

[1]) Siehe meine Arbeit über Narkose, l. c.

[2]) Ruhland, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. **26a**, 772, 1909.

[3]) Garmus, Zeitschr. f. Biol. **58**, 185, 1912.

[4]) Schulemann, Zeitschr. f. experim. Pathol. u. Ther. **11**, 1, 1912.

[5]) Höber und Nast, diese Zeitschr. **50**, 418, 1913.

ziehungen von Osmose, Narkose, pharmakologischer Wirkung, Toxizität usw. zur Oberflächenspannung bekannt, so könnte man sagen, man wolle an der Lipoidtheorie festhalten, so lange bis eine brauchbarere Theorie gefunden sei.

Ein Blick auf die beifolgende Tabelle meiner im Erscheinen begriffenen Abhandlung in Arch. f. d. ges. Physiol. über Narkose zeigt indessen, daß die Beziehungen der ja von der

	Zur Narkose von Kaulquappen erforderliche Konzentration in Molen pro Liter	Capillare Steighöhe der $^1/_4$-mol. wässerigen Lösung bei 15°, Wasser = 91,5 mm	Löslichkeit bzw. Teilungskoeffizient Olivenöl : Wasser nach Overton
Methylalkohol . . .	0,57	88,6	50:∞
Äthylalkohol . . .	0,29	84,0	1:30
Aceton	0,26	80,85	wenig lösl.:∞
Acetaldoxim	0,12	83,5	—
Propylalkohol . . .	0,11	74,0	1:8
Methyläthylketon .	0,09	72,85	∞:5
Methylacetat . . .	0,08	75,0	4:1
Äthyläther	0,07	67,2	4,5:1
Dimethyläthylcarbinol	0,057	54,5	∞:8
i-Butylalkohol . . .	0,045	56,5	ca. 6:1
n-Butylalkohol . . .	0,038	—	∞:12
Äthylacetat	0,03	62,8	∞:15,2
Diäthylketon . . .	0,029	58,2	∞:20
Paraldehyd	0,025	63,9	ca. 3:1
i-Amylalkohol . . .	0,023	37,4	∞:2

Geschwindigkeit der Osmose abhängigen Narkose und der Oberflächenspannung trotz der Abweichungen (siehe darüber Arch. f. d. ges. Physiol., l. c. diese Arbeit) wesentlich nähere sind als zwischen Narkose und dem Teilungskoeffizienten Öl : Wasser, und wenn schon die Lipoidtheorie nicht gut imstande ist, das Verhalten von Stoffen wie Urethan, Chloralhydrat, Pyridin u. a. (siehe Overton, l. c.) zu deuten, so läßt sie völlig im Stich, wenn man die Frage aufwirft, weshalb Phenanthren ein Narkoticum ist, Anthracen, ferner Cetylalkohol aber trotz der guten Lipoidlöslichkeit keine narkotischen Eigenschaften besitzen.

Während ich diese Arbeit niederschrieb, erschien soeben im letzten Hefte dieser Zeitschr. 52, 226 eine vortreffliche Mitteilung über den Einfluß der Anästhetica auf die Oxydone von Battelli und Stern, deren Inhalt sich aufs beste deckt

mit den Ergebnissen meiner narkotischen Arbeit. Die Verfasser zeigen, daß die narkotische Wirkung der Narkotica parallel geht der Vernichtung des von ihnen untersuchten Succinic-Oxydons und daß dieselbe übereinstimmt mit der Fähigkeit der Narkotica, die in den wässerigen Auszügen der Gewebe enthaltenen Nucleoproteide zu fällen. Die Verfasser sprechen sich dann auch gegen die Lipoidtheorie aus und zeigen, daß zwischen Oberflächenspannungen und ihren Werten wesentlich nähere Beziehungen bestehen als gegenüber dem Teilungskoeffizienten Öl : Wasser.

Das ist eine erfreuliche Arbeit, und sie wird dazu beitragen, den Widerstand gegen die Haftdrucktheorie zu überwinden. Man wird allmählich immer mehr erkennen, **daß die treibende Kraft der Osmose weder der osmotische Druck noch die Lipoidlöslichkeit, sondern der Haftdruck ist.** Trotz des Widerspruches oder Stillschweigens von seiten meiner physikalisch-chemischen Fachgenossen hoffe ich auch allmählich mit meinen Darlegungen durchzudringen, daß die Theorien von van't Hoff und auch Arrhenius fundamentale Änderungen werden erfahren müssen (siehe a. a. O., l. c.)

8. Erwiderung auf die Kritik meiner Theorie seitens Herrn Höbers.

Während Herr Höber in der 2. Auflage seines Lehrbuches „Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe“ meiner Theorie eine ablehnende Anmerkung von 14 Zeilen (vgl. S. 177) widmet, handeln in der neuesten 3. Auflage seines vortrefflichen Lehrbuches 4 Seiten von meiner Theorie der Stoffaufnahme. Indessen man wird es mir nicht verdenken, wenn ich mit der ablehnenden Kritik Höbers nicht einverstanden bin. Ich will auf die weniger wichtigen Einzelheiten der Kritik, trotz berechtigter Einwände, hier gar nicht eingehen, und ich gebe Herrn Höber recht, daß ich in meinen ersten diesbezüglichen Abhandlungen auf die besonderen Wirkungen der Membranen nicht genügend Rücksicht genommen habe. Aber es empfiehlt sich, die folgende Stelle von Höbers Kritik wörtlich zu zitieren:

„.... Offenbar unter dem Einflusse dieser Tatsachen hat dann auch Traube allmählich seine ursprüngliche Theorie abgeändert, und zwar in der sehr natürlichen Richtung, daß er nun die Richtung und Geschwindigkeit der Osmose als abhängig von dem Haftdruck der gelösten Stoffe in ihren flüssigen Lösungsmitteln und von dem Haftdruck in der Substanz der Membran ansieht.“ Und nun fährt Herr Höber wörtlich fort:

„Was heißt das aber viel anderes, als daß es auf die spezielle Lösungsaffinität ankommt, sowie es auch Overtons Theorie besagt?"

Sollte ein Forscher von den Fähigkeiten des Herrn Höber hier wirklich den Unterschied meiner und der Overtonschen Anschauungen nicht erkennen?

Ist es etwa dasselbe, wenn Overton das Vorhandensein von Lipoiden als notwendig voraussetzt, während nach meinen Anschauungen Lipoide gar nicht erforderlich sind? Der Haftdruck gegenüber einer nicht lipoiden Membran ist doch nicht identisch mit dem Haftdruck gegenüber einer lipoiden Membran, und nebenbei erwähnt, ist das Verhältnis des Haftdruckes gegenüber Lipoid und Wasser nicht einmal identisch mit dem Teilungskoeffizienten.

Und nun schreibt Höber weiter:

„....Ferner macht Traube selbst darauf aufmerksam, daß, wenn man verschiedene lipoidlösliche Stoffe bis zu ihrer hämolytischen Grenzkonzentration in physiologischer Kochsalzlösung auflöst, die so erhaltenen Lösungen keineswegs alle die gleiche Oberflächenspannung haben, wie es der Fall sein müßte, wenn es bei der Hämolyse, als diosmotischer Vorgang aufgefaßt, allein auf die Oberflächenspannung der wässerigen Lösung, nicht auf die Lipoidlöslichkeit der wirksamen Stoffe ankäme."

Hätte Herr Höber meine Arbeiten aufmerksam gelesen, so würde er mir wohl diesen Vorwurf nicht gemacht haben. Isocapillare Lösungen erwiesen sich tatsächlich in osmotischer Beziehung äquivalent bei den Versuchen Czapeks und Kischs an Pflanzenzellen, weil hier die Lipoide zurücktreten, bei den Blutkörperchen ist aber der Haftdruck gegenüber den Lipoiden neben dem Haftdruck gegenüber dem Wasser zu berücksichtigen; Gleichheit der Oberflächenspannungen war hier dementsprechend nicht zu erwarten. Und nun schließt Herr Höber:

„....Danach muß man sagen, daß die Theorie der Osmose, die J. Traube in einer Flut von Abhandlungen immer wieder den vorherrschenden Auffassungen entgegenstellt, in physiologischer Richtung keinen Fortschritt bedeutet; er übersetzt das, was im vorigen Kapitel über die diosmotischen Vorgänge bei den Zellen gesagt wurde, nur in eine andere Sprache, in der er vom Verhältnis des Haftdrucks spricht, wo es bisher Lipoidlöslichkeit hieß."

Es scheint mir, daß die Flut von Abhandlungen doch nicht ganz überflüssig war, und vielleicht gelingt es bei weiterem Anwachsen dieser Flut, schließlich auch noch Herrn Höber zu überzeugen.

Über Narkose.
Bemerkungen zu den Arbeiten der Herren Vernon und Winterstein.

Von

J. Traube.

(Aus der Technischen Hochschule, Charlottenburg.)

(Eingegangen am 2. Juli 1913.)

In dieser Zeitschrift sind vor kurzem zwei Arbeiten erschienen: 1. von Vernon[1]): Die Rolle der Oberflächenspannung und der Lipoide für die lebende Zelle; 2. von Winterstein[2]): Beiträge zur Kenntnis der Narkose. Diese Arbeiten stehen in nahen Beziehungen zu einer vor kurzem von mir an das Arch. f. d. ges. Physiol. gesandten und noch nicht veröffentlichten Mitteilung über Narkose[3]), so daß ich mich unter Hinweis auf die nähere Begründung in jener Arbeit veranlaßt sehe, die folgenden zusammenfassenden Sätze über den wesentlichsten Inhalt meiner Mitteilung hier wiederzugeben. Ich kam zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Narkotica sind, soweit dieselben in Wasser löslich sind, Stoffe von geringem Haftdrucke, die dementsprechend die Oberflächenspannung und den Binnendruck von Wasser, sowie somit auch wässeriger Zellflüssigkeiten, vermindern. Je geringer der Haftdruck eines wasserlöslichen Narkoticums ist, um so größer ist im allgemeinen seine narkotische Wirkung. Ist der Haftdruck eines flüchtigen Narkoticums gegenüber dem Wasser sehr gering oder nahezu gleich Null (flüchtige Kohlenwasser-

---

[1]) Vernon, diese Zeitschr. 51, 1, 1913.

[2]) Winterstein, diese Zeitschr. 51, 143, 1913.

[3]) Siehe daselbst auch die sich anschließende Mitteilung über Katalyse.

stoffe, Halogenalkyle usw.), so ist die Erniedrigung der Oberflächenspannung des Wassers kein genaues Maß des Haftdrucks. Es besteht indessen bei solchen Narkoticis eine erhebliche Binnendrucksverminderung infolge der feinen Emulgierung derartiger Narkotica. Solche Stoffe haben auch in Berührung mit Wasser einen bedeutenden Dampfdruck.

2. Je mehr ein narkotischer Stoff die Oberflächenspannung des Wassers vermindert, je geringer der Haftdruck eines solchen Stoffes ist, um so leichter geht derselbe in die Oberfläche, um so leichter wird derselbe im allgemeinen in Lipoiden gelöst oder von anderen Oberflächen adsorbiert, um so leichter auch diosmiert der Stoff im allgemeinen in das Zellinnere hinein, auch wenn die Wandungen nicht lipoidhaltig sind. Eine gesetzmäßige Reziprozität zwischen Erniedrigung der Oberflächenspannung und Lipoidlöslichkeit sowie Adsorption in Nichtlipoiden besteht indessen nicht, ebenso nicht zwischen Adsorption und Osmose. Es handelt sich nur um Regeln.

3. Der vermehrte Lipoidgehalt der Ganglienzellen hat zwar einen Einfluß auf die Geschwindigkeit und Größe der Adsorption der Narkotica sowie den Grad ihrer narkotischen Wirksamkeit, aber derselbe ist trotzdem nicht der springende Punkt für deren Wirkung; der Lipoidgehalt beeinflußt die narkotische Wirkung, aber er schafft dieselbe nicht, auch lipoidfreie Zellen werden narkotisiert.

4. Je mehr ein Stoff von geringem Haftdruck im Wasser durch Lösung oder Emulgierung die Oberflächenspannung und den Binnendruck der Zellflüssigkeiten vermindert, um so mehr verändert derselbe den physikalischen Zustand der gelösten Stoffe, indem vor allem die Kolloide aggregiert werden und deren Löslichkeit verringert wird.

5. Durch solche Zustandsänderungen der Kolloide (Eiweißstoffe und Lipoide) sowie durch den geringeren Druck im Innern der Flüssigkeit werden gewisse chemische Vorgänge — in erster Linie Oxydationsvorgänge — aber auch andere verlangsamt oder völlig gehemmt.

6. Durch die Gegenwart der Narkotica, die sich nach Gibbs-Thomsons Prinzip an den Zellwänden und den Grenzflächen zweier Phasen anreichern, wird der tote Raum Liebreichs, also der Raum, in dem etliche Reaktionen gehemmt

werden, vergrößert. Gerade in den mehrphasigen lipoidreichen Nervenzellen wird dieser Umstand um so mehr in Betracht kommen, als durch die „Semikoagulation“ der Kolloide die Phasenmenge und somit die Berührungsfläche der Phasen vergrößert wird.

7. Indem die narkotischen Stoffe sich an den Grenzflächen von Zellwandungen und Zellflüssigkeiten anreichern, vermindern sie die elektrischen Kontaktpotentiale und wirken somit direkt hemmend auf die Fortpflanzung von Bewegungs- und Empfindungsreizen seitens der Nervenzentren.

8. Die verlangsamenden und hemmenden Wirkungen, welche die Stoffe von geringem Haftdruck gegenüber dem Wasser einerseits auf die durch Vermittlung der Zellkolloide bewirkten Oxydationsvorgänge und andere Vorgänge im Zellinnern und auf die elektrischen Vorgänge an den Grenzflächen andererseits ausüben, sind die Ursache desjenigen Zustandes, welcher als Narkose bezeichnet wird.

9. Die vorliegende Theorie, die an einen älteren Gedanken von Richet sich anlehnt, verknüpft die entsprechend erweiterte Theorie von Verworn mit den Vorstellungen von Cl. Bernard und O. Warburg einerseits, Mac Callums andererseits. An die Stelle der Lipoidtheorie tritt die Theorie des Haftdrucks, doch wird die sekundäre Bedeutung der Lipoide im Sinne von Overton und Hans Meyer anerkannt.

Indem in bezug auf die nähere Begründung dieser Sätze auf die erwähnte Arbeit verwiesen wird, möchte ich mich nunmehr zu der Mitteilung des Herrn Vernon wenden.

Herr Vernon, welchem wir u. a. eine schöne Arbeit über die Wirkung von Narkoticis auf die Nierenoxydase verdanken, hat in der vorliegenden Mitteilung an einer Arbeit Czapeks[1]): „Über eine Methode zur direkten Bestimmung der Oberflächenspannung der Plasmahaut der Pflanzenzellen“ eine Kritik geübt, die, wie mir scheint, in keiner Weise berechtigt ist.

An dieser Arbeit Czapeks bin ich aber nicht weniger interessiert als Czapek selbst, denn die Feststellung Czapeks, daß eine Exosmose aus Pflanzenzellen dann eintritt, wenn dieselben in bestimmte — isocapillare — wässerige Lösungen der

---

[1]) Czapek, Ber. d. Deutsch. botan. Ges. 88, 159 und 480, 1910 und Monographie Jena 1911.

verschiedensten Alkohole, Ketone, Ester, Äther, Urethane gelegt werden, bildet eine so vortreffliche Bestätigung meiner Ansichten über Osmose und Narkose, daß ich mir eine bessere Bestätigung meiner Theorie des Haftdrucks nicht wünschen kann.

Nun bezweifelt Vernon, ohne sich gegen die Versuchsergebnisse von Czapeks Arbeiten irgendwie zu wenden[1]), die Berechtigung von Czapeks Schlüssen, indem er darauf hinweist (siehe S. 3 u. f.), daß zwar für 22 Verbindungen die von Czapek gefundene gesetzmäßige Beziehung gelte, aber für nicht weniger als 7 Stoffe ganz erhebliche Abweichungen sich geltend machten. Während bei den genannten 22 Stoffen der betreffende Wert der Oberflächenspannung im Mittel der Zahl 0,67 entspricht, tritt bei jenen 7 Ausnahmen Exosmose bereits ein bei Oberflächenspannungswerten von 0,82 bis 0,99.

Sehen wir uns nun diese 7 Stoffe einmal näher an! Es sind Äthylenglykol, Glycerin, Acetonitril, Nitromethan, Phenol, Chloralhydrat und Chloroform.

Wie Herr Vernon Stoffe wie Glykol und Glycerin hier, wo es gilt, die Eigenschaften von in die Zellen schnell eindringenden Narkoticis zu besprechen, nur erwähnen kann, ist mir nicht recht verständlich. Hier handelt es sich um Stoffe von großem Haftdruck, für die Czapeks Beziehung ebensowenig gültig ist, wie etwa für eine Zucker- oder Salzlösung (vgl. Overton, Die Narkose. Jena. S. 116).

Daß Acetonitril und Nitromethan besonders giftige Wirkungen ausüben, ist sehr naheliegend. Schon Overton weist l. c. S. 105 darauf hin, daß beim Acetonitril vor Auftreten der Narkose „eine gewisse Tendenz zu Krämpfen“ vorhanden sei. Das Antisepticum Phenol scheidet aus demselben Grunde aus, ganz abgesehen davon, daß es sich hier auch um die Wirkung einer schwachen Säure handelt, und das folgt ja aus Herrn Vernons eigenen Untersuchungen, daß Säuren nicht mit den indifferenten Stoffen verglichen werden können. Was das

---

[1]) Wünschenswert erscheint es mir allerdings, Czapeks Ergebnisse mit einem anderen Apparat zur Messung der Oberflächenspannung (Stalagmometer oder Capillarimeter) nachzuprüfen, denn die von ihm verwandte Methode dürfte doch wohl jenen Methoden an Genauigkeit nicht gleichkommen.

Chloralhydrat betrifft, so möge der Hinweis auf die Ausführungen Overtons, l. c. S. 107 bis 109, genügen, um zu zeigen, welche Schwierigkeit dieses Narkoticum auch dem Begründer der Lipoidtheorie bereitet. Auch verweist Overton darauf (S. 109), daß „Lösungen von Chloralhydrat immer etwas sauer reagieren“.

Es bleibt noch das Chloroform. Dieses Narkoticum ist zwar nicht von Herrn Czapek geprüft worden, indessen Vernon nimmt an, daß dieses Narkoticum sich voraussichtlich bei der Exosmose ebenso ausnahmsweise verhalten werde wie bei den Untersuchungen von Helene Nothmann-Zuckerkandl über die Plasmaströmung. Zugegeben, daß Herr Vernon recht hat, so halte ich mich für berechtigt, bei diesen und anderen nur sehr wenig in Wasser löslichen und sehr flüchtigen Narkoticis (Kohlenwasserstoffe, Halogenalkyle) von sehr geringem Haftdruck im Wasser darauf hinzuweisen (vgl. meine Ausführungen am Schlusse meiner zitierten Mitteilung im Arch. f. d. ges. Physiol. l. c.), daß hier die Oberflächenspannung der wässerigen Lösung kein Maß der narkotischen Wirkung ist. Chloroform und ähnliche Stoffe wirken nach den Versuchen von Herrn Dr. Berceller (siehe l. c.) als solche in emulgierter Form stark verringernd auf Binnendruck und Oberflächenspannung. Es sind Stoffe, die wegen des geringen Haftdrucks gegenüber dem Wasser in Berührung mit Wasser einen großen Dampfdruck haben, und dieser Dampfdruck der vorigen Lösung oder Emulsion steht hier in ebenso inniger Beziehung zum Haftdruck[1]), als die Oberflächenspannung.

Die in meinem Laboratorium ausgeführten Versuche Herrn Dr. Bercellers haben gezeigt, daß wegen der Flüchtigkeit des Chloroforms die Oberflächenkonzentration sich derart ändert, daß die üblichen Messungen nach der Tropf- oder auch Steighöhenmethode zu größten Fehlern führten.

Daß Herr Vernon gerade jene verschiedenen Ausnahmen Herrn Czapeks verwirft, ist um so weniger gerechtfertigt, als bei seinen eigenen Untersuchungen über die Schädigung der Nierenoxydase Vernon zu ganz denselben Annahmen gelangt. Man vergleiche seine Ausführungen auf S. 11 über

[1]) Traube, Ber. d. Deutsch. physikal. Ges. 10, 901, 1908.

Acetonitril und Nitromethan. Er spricht daselbst „über den erstaunlich ausgedehnten Wirkungsumfang“ dieser Verbindungen, die allem Anscheine nach eine Verbindung mit dem Nierengewebe eingehen, so daß sie nicht wie die anderen Narkotica durch Auswaschen aus demselben entfernt werden können“.

S. 6 weißt Vernon darauf hin, daß Äthylenglykol und Glycerin keine „wahren Narkotica“ sind. Aus den Ausführungen S. 11 und S. 18 ergibt sich die starke Wirkung irgendwie saurer Verbindungen.

Auf S. 10 verweist er darauf, daß die verschiedensten Substanzen „außer Chloroform“ Kurven mit scharfem Profil ergaben, und S. 13 findet Vernon „die enge Beziehung der Nierenoxydasewerte zu den Echeveriawerten recht bemerkenswert“.

Vernon ist allerdings in dieser Beziehung, wenn es sich um die Diskussion der mehr oder weniger großen und meist sehr mangelhaften Proportionalität der Narkose-Exosmose und Oxydasewerte in den verschiedenen Tabellen handelt, ein wenig allzu zufrieden. Die hier vorhandenen großen Abweichungen bespricht Vernon keineswegs so kritisch, wie die Ergebnisse Czapeks. Vernon vergißt auch, daß für die Exosmose in den wenig lipoidlöslichen Pflanzenzellen keine Proportionalität mit der Narkose lipoidreicher tierischer Zellen zu erwarten ist. Auffallend dagegen sind die auch von mir in meiner Abhandlung im Arch. f. d. ges. Physiol. hervorgehobenen nahen Beziehungen zwischen Oxydase- und Hämolysewerten (vgl. S. 23 der Abhandlung von Vernon). Nur darf man daraufhin keine Lanze brechen zugunsten der Lipoidtheorie, denn beispielsweise Schwefelsäure ist gewiß nicht lipoidlöslich, und Vernon selbst hat ja (vgl. S. 22) Zweifel, ob „die Säurekonzentrationen, welche die Oxydase schädigen“ und „die rote Blutkörperchen lackfarben machen“, „genau in derselben Weise wirken“, da die Säuren zum Teil „nur wenig lipoidlöslich sind“. Vergleiche in dieser Beziehung meine Arbeit im Arch. f. d. ges. Physiol.

Wenn ich mich hiernach mit den diesbezüglichen Ausführungen Vernons ganz und gar nicht einverstanden erklären kann, bin ich mit Herrn Winterstein in vielen Punkten derselben Meinung, besonders auch in der Hinsicht, daß die Narkotica nicht lediglich auf Oxydationsvorgänge hemmend wirken,

daß also die Narkose nicht als ein reiner Erstickungsvorgang zu betrachten ist; aber wenn Herr Winterstein, als einstiger Schüler Verworns, bemerkt (S. 164), daß „die ganze Erstickungstheorie der Narkose steht und fällt mit der von der Verwornschen Schule gemachten Annahme eines Sauerstoffvorrats in den verschiedenen Geweben usw.“, so meine ich, daß es sich hier nur um eine Erweiterung von Verworns Theorie handelt, nicht aber um eine Vernichtung derselben, um so weniger als Verworn[1]) selbst „die Möglichkeit, daß das Narkoticum noch andere Veränderungen in der lebendigen Substanz, die nicht auch bei der Erstickung auftreten, hervorbringt, nicht direkt ausschließt“, wenn er dieselben auch für wenig wahrscheinlich hält.

Recht hat Winterstein sicherlich auch, wenn er auf S. 169 darauf hinweist, „daß mit der Lipoidtheorie überhaupt das letzte Wort noch lange nicht gesprochen ist“.

Ich hoffe, daß Herr Winterstein in meiner Arbeit eine befriedigende Antwort auf einige der von ihm hervorgehobenen Probleme finden wird.

Anmerkung während der Korrektur.

In Bd. 52 dieser Zeitschrift, S. 226, erschien soeben eine vortreffliche Abhandlung über den Einfluß der Anaesthetica auf die Oxydone von Battelli und Stern. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich in jeder Beziehung mit denjenigen meiner Mitteilung über Narkose in Pflügers Archiv und bilden eine willkommene Ergänzung meiner in obigen Sätzen ausgesprochenen Ansichten.

[1]) Verworn, Die Narkose. Jena 1912.

Weiterer Beitrag zur Frage nach der Wirkung der Wasserstoffionenkonzentration auf Kolloidgemische.

Erwiderung auf die Arbeit von Landsteiner[1]).

Von

L. Michaelis und H. Davidsohn.

(Eingegangen am 18. Juli 1913.)

Zwei elektroamphotere Substanzen, die nebeneinander in Lösung sind, binden, wie wir früher[2]) auseinandergesetzt haben, einander am stärksten bei einer derartigen Wasserstoffionenkonzentration ihrer Lösung, daß der eine Ampholyt positiv, der andere gleichzeitig negativ aufgeladen wird. Die Wirkung entgegengesetzt geladener Kolloide äußert sich nun in der Regel in einer Fällung ihrer Verbindung. Denken wir uns in Lösung z. B. ein Kolloid, dessen isoelektrischer Punkt gleich 10^{-6} ist und ein zweites Kolloid mit dem isoelektrischen Punkte 10^{-2}, so wird die stärkste Flockung bei einer [H] von ungefähr 10^{-4}, jedenfalls zwischen 10^{-6} und 10^{-2} stattfinden, weil in diesem Gebiete die beiden Kolloide entgegengesetzte Ladung haben. Wir haben an geeigneten Beispielen nachgewiesen, daß diese theoretische Überlegung durch die Tatsachen bestätigt wird. Andererseits haben wir[3]) in einer späteren Arbeit gezeigt, daß bei den sog. biologisch-spezifischen Fällungen (Präcipitine, Agglutinine) eine solche Gesetzmäßigkeit auffallenderweise nicht erkennbar ist. Dieser Befund stand nun in Widerspruch zu der Annahme von Landsteiner, der die Behauptung aufgestellt hat, daß gerade die spezifischen Fällungen auf elektrischen Gegensätzlichkeiten der Komponenten beruhen. Nach unseren Untersuchungen mußten wir daher zu dem Schlusse

---

[1]) Diese Zeitschr. **50**, 176.

[2]) L. Michaelis und H. Davidsohn, diese Zeitschr. **39**, 496.

[3]) Dieselben, ibid. **47**, 59.

kommen, daß die Annahme von Landsteiner durch den Versuch nicht gestützt werden kann.

Hiergegen hat nun Landsteiner[1]) kürzlich Einwände erhoben; erstens meint er, daß die Ladung eines amphoteren Elektrolyten bzw. Kolloids überhaupt nichts Feststehendes sei, sondern durch die Gegenwart eines zweiten Kolloids ad hoc umgekehrt werden könne.

Hierauf erwidern wir folgendes: Selbstverständlich ist jeder Ampholyt bei jeder beliebigen $[H^{\cdot}]$ in allen seinen drei Formen, als Anion, als Kation und als unelektrisches Molekül vorhanden; es braucht nicht erst durch die Gegenwart eines fremden Stoffes eine „Umladung" einzutreten. Worauf es aber ankommt und was in weitesten Grenzen mit der $[H^{\cdot}]$ variiert, ist die Konzentration, in der jede der drei Molekülarten vorhanden ist. So wird z. B. Gelatine, deren isoelektrischer Punkt $2 \cdot 10^{-5}$ ist, bei $[H^{\cdot}] = 10^{-7}$ ganz überwiegend als Anion, zu einem nur sehr kleinen Teile als unelektrisches Molekül und in außerordentlich geringer Menge als Kation vorhanden sein. Wenn wir nun bei einer $[H^{\cdot}] = 10^{-7}$ Gerbsäure hinzugeben, die eine unlösliche Verbindung mit Gelatine bildet, können die Gerbsäure-Anionen zunächst jene sehr kleine Menge der Gelatine-Kationen an sich reißen und ausfällen; diese Kationen werden nun nach dem Massenwirkungsgesetz immer wieder nachgeliefert, und schließlich wird eine merkliche Menge der Gelatine-Tanninverbindung ausfallen, obwohl wir bei einer $[H^{\cdot}]$ arbeiten, in der der überwiegende Anteil der Gelatine die gleiche Ladung hat wie die Gerbsäure. Man mag diesen Vorgang, wenn man durchaus will, als eine „Umladung" der Gelatine durch Gerbsäure bezeichnen. Wir halten es aber nicht für zweckmäßig, diesen Begriff einzuführen. Im übrigen kann man sich die Gelatine-Tanninverbindung ebensogut durch Vereinigung der unelektrischen Gelatinemoleküle und der unelektrischen Tanninmoleküle entstanden denken; und das ist eine mindestens so plausible Vorstellung, weil man hier nicht die in extrem geringer Menge vorhandenen Gelatine-Kationen heranzuziehen braucht. Wir wollen diese Überlegung durch ein analoges Beispiel erläutern.

Die Wirkung von NaOH auf CH_3COOH in wässeriger Lösung läßt sich auf folgende zwei Weisen darstellen, wenn wir

[1]) K. Landsteiner, diese Zeitschr. 50, 176.

berücksichtigen, daß ja in der wässerigen Lösung folgende Molekülgattungen nebeneinander vorhanden sind: NaOH, $Na^{\cdot}$, OH', CH_3COOH, CH_3COO', $H^{\cdot}$, CH_3COONa:

1. entweder $Na^{\cdot} + CH_3COO' = CH_3COONa$
2. oder $NaOH + CH_3COOH = CH_3COONa + H_2O$.

In welchem Betrage sich im Einzelfalle jede dieser beiden einwandsfrei möglichen Reaktionen an der Bruttoreaktion beteiligt, wird verschieden sein. Übertragen wir diese Ausführung auf das Beispiel Gerbsäure + Gelatine, so sind folgende zwei Reaktionen möglich:

1. Gelatinekation + Gerbsäureanion → Gelatinetannat,
2. Gelatine + Gerbsäure → Gelatinetannat + H_2O

Das Optimum der Gelatinetannatbildung wird also bei derjenigen $[H^{\cdot}]$ liegen, bei der entweder das Produkt [Gel.-Kationen]·[Gerbs.-Anionen] oder das Produkt [Gelatine]·[Gerbsäure] ein Maximum ist. Man könnte bei oberflächlicher Betrachtung meinen, daß es dann zwei Maxima geben müsse; aber es läßt sich aus dem Massenwirkungsgesetz leicht ableiten, daß die beiden Maxima zusammenfallen.

Um nun auf den Einwand von Landsteiner zurückzukommen, so möchten wir folgendes feststellen. Wir haben niemals in Zweifel gezogen, daß zwei amphotere Stoffe bei jeder beliebigen $[H^{\cdot}]$ aufeinander einwirken können, wir haben nur behauptet, daß das Maximum der Einwirkung bei einer ganz bestimmten $[H^{\cdot}]$ stattfindet. Um das zu beweisen, haben wir eine so hohe Verdünnung der Kolloide gewählt, daß die Einwirkung auf alle Fälle gering, und die Erkennung eines Maximums überhaupt möglich war. Mischt man z. B. eine 10%ige Nucleinsäurelösung und eine 10%ige Albuminlösung, so ist, wenn die Reaktion nicht gerade extrem alkalisch ist, die Fällung so enorm, daß ein Optimum überhaupt nicht erkennbar ist. Geht man aber in der Konzentration der Kolloide allmählich herunter, so gelangt man schließlich zu Konzentrationen, bei denen ein deutliches Maximum bei einer bestimmten $[H^{\cdot}]$ erkennbar wird. Dieses Maximum findet sich, wie die früheren Beispiele zeigen und wie auch das folgende Beispiel wieder bestätigt, bei einer $[H^{\cdot}]$, bei der die beiden Komponenten entgegengesetzte Ladung haben:

Gelatinelösung . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
n-NaOH	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tanninlösung . . .	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Wasser	6,0	5,9	5,8	5,6	5,2	4,4	2,8	0,0	4,7	3,4
n-Essigsäure . . .	1,0	1,1	1,2	1,4	1,8	2,6	4,2	7,4	—	—
10n-Essigsäure . .	—	—	—	—	—	—	—	—	1,3	2,6

Derartige Versuche wurden nun bei verschiedener Konzentration der Gelatine und des Tannins angestellt; das jeweilige Fällungsoptimum wurde elektrometrisch gemessen. Es ergab sich:

Konzentration der Gelatine %	Konzentration des Tannins %	Fällungsoptimum
1,0	1,0	unscharf von $2 \cdot 10^{-6}$ bis weit über 10^{-4}
1,0	0,1	$1,5 \cdot 10^{-4}$
0,5	0,1	$9 \cdot 10^{-5}$
0,25	0,1	$2 \cdot 10^{-4}$
0,1	0,1	$4 \cdot 10^{-5}$
0,1	1,0	$2 \cdot 10^{-5}$ bis $8 \cdot 10^{-5}$

Das Fällungsoptimum liegt also stets etwas oberhalb des isoelektrischen Punktes der Gelatine ($2 \cdot 10^{-5}$), derart, daß schon reichlich Gelatine-Kationen vorhanden und die Tannin-Anionen noch nicht zu sehr unterdrückt sind; in dem ersten Versuche ist das Optimum wegen zu hoher Konzentration der beiden Stoffe nicht gut erkennbar, aber doch so weit, daß kein Widerspruch mit den anderen Befunden besteht.

Hiermit fällt auch der zweite Einwand von Landsteiner, der besagt, daß sich Eiweiß bei neutraler Reaktion sowohl mit positiven wie mit negativen Kolloiden bindet; diese Tatsache haben wir nicht bezweifelt. Trotzdem läßt sich gerade am Eiweiß die Wirkung der $[H^{\cdot}]$ sehr deutlich demonstrieren. Das stets elektronegative Kaolin z. B. adsorbiert zwar Eiweiß unter allen Umständen, am besten aber, wenn man das Eiweiß durch Ansäuerung positiv aufladet. Als Enteiweißungsmittel ist Kaolin daher überhaupt nur nach vorheriger Ansäuerung der Lösung brauchbar. Umgekehrt wirkt das elektropositive Eisenhydroxyd bei neutraler oder sogar leicht alkalischer Reaktion am besten enteiweißend.

Schließlich führt Landsteiner als weiteren Einwand gegen unsere Ausführungen an, daß koaguliertes Serumeiweiß ziemlich

unabhängig von der [H˙] von den verschiedensten sauren und basischen Farbstoffen angefärbt wird. Nach dem oben Gesagten wird man erkennen, daß diese Behauptungen an sich noch nicht in einem Gegensatz zu unserer Theorie stehen; wir müssen nur den Beweis erbringen, daß unser Gesetz wieder zutage tritt, wenn wir die Farbstoffkonzentration genügend erniedrigen.

Zu diesem Zweck machten wir folgende Versuche: Als färbbares Substrat verwendeten wir Gelatinescheibchen, die aus Platten erstarrter 10%iger Gelatinelösung ausgestanzt waren. Wir wählten dieses Objekt, weil der isoelektrische Punkt der Gelatine uns gut bekannt ist[1]), und weil die Durchsichtigkeit der Gelatine eine bessere Beobachtung ermöglicht. Freilich kann man wegen der Quellung der Gelatine bei höheren Aciditäten die Variation der [H˙] nur innerhalb gewisser Grenzen halten, aber diese Grenzen reichten für den vorliegenden Zweck aus. Die Wirkung einer Farbstofflösung kann sich gegen ein Gelatinescheibchen in doppelter Weise zeigen. Einmal diffundiert der Farbstoff in die capillaren Räume der Gelatine hinein, andererseits bildet sich, wenn der Farbstoff „anfärbt", eine Verbindung mit der Gelatine. Wenn der Farbstoff gar nicht anfärbt, so zeigt sich die reine Diffusion dadurch, daß bei rechtzeitiger Unterbrechung der Färbung eine leichte diffuse Imbibition zu erkennen ist, deren Intensität niemals größer ist als die der Farblösung und nach der Mitte zu allmählich abnimmt. Dieses Verhalten ist nur bei sehr leicht diffundierenden Farbstoffen, wie Eosin, zu beobachten; bei schwerer diffundierenden Farbstoffen, wie Methylviolett, bemerkt man von dieser Diffusion bei kurzer Einwirkung überhaupt nicht viel. Tritt dagegen eine Anfärbung der Gelatine ein, so färbt sich nach kurzer Zeit die Randpartie der Gelatine intensiv, während das Zentrum blaß ist, und es fehlt der für die reine Diffusion charakteristische Übergang, weil der hineindiffundierende Farbstoff sofort festgehalten wird. Charakteristisch für die beginnende Anfärbung der Gelatine ist daher die starke Randfärbung bei ungefärbtem Zentrum. Die Versuche sind in folgender Tabelle zusammengestellt, aus der die übrige Anordnung leicht zu sehen ist.

[1]) Chiari, diese Zeitschr. 33, 167. — L. Michaelis u. W. Grineff, diese Zeitschr. 41, 373.

Tabelle.

$^n/_{10}$-Natriumacetat	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
$^n/_{100}$-Essigsäure	—	0,25	2,25	—	—	—
$^n/_{10}$- "	—	—	—	0,50	2,50	—
$^n/_{1}$- "	—	—	—	—	—	2,50
Dest. Wasser	2,50	2,25	0,25	2,00	—	—
Farbstofflösung	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Säurefuchsin 0,05 ‰ nach 6 Min. Färbung	(+)[1]	+	+	+(+)	++	+++
" 0,01 ‰ " 10 " "	(+)	(+)	+	+	+(+)	++(+)
" 1,25 ‰ " 8 " "	+	+(+)	++	++	+++	+++
Eosin 0,7 % nach 4 Min.	(+)	(+)	(+)	(+)	+	++
" 0,7 % " 7 "	(+)	(+)	(+)	(+)	+	++
Gentianaviolett (750 fache Verdünnung der gesättigten Lösung) nach 28 Min.	++	++	+	+	(+)	((+))
do. " 60 "	+++	++	++	+	(+)	((+))
Nilblau 0,3 ‰ nach 8 Min.	++	++	++	+(+)	+	(+)
" 0,3 ‰ " 6 "	++	++	++	+(+)	+	(+)
Fuchsin 0,13 ‰ nach 45 Min.	+++	++	++	++	+	(+)
" 0,06 ‰ " 20 "	++	+	+	+	+	(+)
[H˙]	ca. 10^{-7}	$1 \cdot 10^{-6}$	$9 \cdot 10^{-6}$	$2 \cdot 10^{-5}$ (isoelektr. Punkt der Gelatine)	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$

Es ergibt sich somit bei allen sauren Farbstoffen eine Zunahme des Anfärbungsvermögens mit steigender [H˙], umgekehrt bei allen basischen Farbstoffen eine Zunahme der Färbung mit fallender [H˙].

Der isoelektrische Punkt der Gelatine stellt, wie zu erwarten war, keine scharfe Scheidewand dar, wohl aber läßt sich sagen, daß das Optimum der Färbung mit basischen Farbstoffen auf der einen, mit sauren Farbstoffen auf der anderen Seite des isoelektrischen Punktes liegt.

Färbt man elektroamphotere Substanzen (Trockenpräparate von roten Blutkörperchen u. dgl.) mit Gemischen von sauren und basischen Farbstoffen, so überwiegt in Übereinstimmung mit den entwickelten Anschauungen je nach der Wasserstoffionenkonzentration der Farblösung die basophile oder die acidophile Natur des färbbaren Substrats, und diese Beobachtung

[1]) Die Zahl der Kreuze bedeutet den Grad der Anfärbung; ein eingeklammertes Kreuz hat eine geringere graduelle Bedeutung als ein offenes.

soll den Ausgangspunkt einer späteren Mitteilung bilden, auf die wir zunächst nur hinweisen wollen.

Wir haben also unter Berücksichtigung der bisher vorliegenden Untersuchungen keine Veranlassung, von der Behauptung abzugehen, daß die unspezifische Affinität zweier amphoterer Kolloide ein Optimum zeigt bei einer Reaktion, welche die Kolloide entgegengesetzt elektrisch lädt, daß aber dieses Gesetz bei den von uns untersuchten spezifischen Fällungen nicht bestätigt werden kann, indem hier bei genügender Verdünnung ein wenn auch breites Optimum der Wasserstoffionenkonzentration zwar erkennbar ist, aber nicht die erwartete Lage zwischen den isoelektrischen Punkten der Komponenten aufweist.

Über die photochemische Synthese der Kohlenhydrate.

II. Richtigstellung der Bemerkungen von Walther Löb.

Von

Julius Stoklasa, J. Šebor und W. Zdobnický.

(Eingegangen am 20. Juni 1913.)

Auf unsere I. Richtigstellung der Bemerkungen von Walther Löb, die in dieser Zeitschr. 47, Heft 2, 1912 erschienen ist, hat Walther Löb in derselben Zeitschr. 48, 257, 1913 abermals versucht, seine irrtümlichen Angaben und nicht unwesentlichen Versuchsfehler zu verdecken. Allein man erkennt auf den ersten Blick, daß diese Antwort nichts anderes als einen Rückzug bedeutet.

In der Antwort Löbs heißt es wörtlich:

„Es wird Stoklasa und seine Mitarbeiter interessieren, daß Brodie bereits 33 Jahre vor mir diese Beobachtung gemacht hat. Die genaue Angabe hierüber findet man in meinen Arbeiten."

Diesen Hinweis hätte sich Löb ersparen können, wenn er unsere Arbeit „Photochemische Synthese der Kohlenhydrate aus Kohlensäureanhydrid und Wasserstoff in Abwesenheit von Chlorophyll"[1]) genau gelesen hätte. Auf Seite 434 lautet es nämlich dort:

„Brodie[2]) hat einen elektrischen Strom um eine Röhre zirkulieren lassen, durch die Kohlensäure, gemischt mit Wasserstoff, strömte, und auf diese Weise Ameisensäure erhalten, während ein Gemenge von Kohlenoxyd mit Wasserstoff Methangas lieferte. Bald darauf gibt Brodie an[3]), daß er aus Wasserstoff und Kohlensäure entweder Kohlenoxyd und Methangas, oder unter etwas veränderten Bedingungen auch etwas Formaldehyd erhalten habe. Doch stützt sich der Nachweis des Formaldehyds

---

[1]) Julius Stoklasa und Wenzel Zdobnický, diese Zeitschr. 30, 433, 1911.

[2]) Brodie, Berl. Ber. 1873, 573.

[3]) Liebigs Ann. 174, 284.

nur auf die eudiometrische Analyse des Gasgemenges und kann daher wohl nicht als sicher gelten."

Daraus geht hervor, daß uns die Arbeiten Brodies vielleicht eher bekannt waren wie Herrn Löb.

Löb scheint dem Versuche bezüglich der Oxydation des Formaldehydes in einem offenen Gefäße eine große Bedeutung zuzuschreiben und zieht daraus Folgerungen, die nicht zutreffen, indem er annimmt, daß wir aus dem Vorhandensein von Kohlensäure — und nicht aus dem Verschwinden von Formaldehyd und der Ameisensäure — auf eine Oxydation des Formaldehydes geschlossen hätten.

Hier handelt es sich lediglich um einen Vorversuch. Um den Verlauf der Reaktionen näher kennen zu lernen, haben wir einwandfreie Versuche ausgeführt, die in unserer Arbeit „Über die photochemische Synthese der Kohlenhydrate unter Einwirkung der ultravioletten Strahlen"[1]) auf Seite 343 ausführlich beschrieben sind.

Nicht uninteressant ist, wie Löb seine Versuchsfehler verbergen will. Bezüglich der Einwirkung der ultravioletten Strahlen auf Kaliumbicarbonat bei Gegenwart von Ferroverbindungen behauptet er nämlich, daß sich eine große Menge Wasserstoff aus Eisenoxydulsulfat in Gegenwart von Kalilauge entwickelt.

Wir haben neuerlich mehrere solche Versuche angestellt, deren Anordnung bereits in unserer vorigen Richtigstellung genau geschildert wurde, wo der Zutritt von Luft völlig ausgeschlossen war; sie ergaben, daß sich bei 60 bis 80° binnen 5 Stunden höchstens 0,2 ccm Wasserstoff bildeten[2]). Walther Löb aber will beobachtet haben, daß sich in 10 Minuten 13,8 ccm Wasserstoff entwickelten!

Wären die Beobachtungen Löbs richtig, müßten also in 5 Stunden 414 ccm Wasserstoff entstehen. Wir aber haben gefunden, daß sich während dieser Zeit höchstens 0,2 ccm Gas bilden; das sind nur Spuren, in denen sich Wasserstoff überhaupt nicht ohne weiteres nachweisen ließ. Aus dieser sich gebildeten angeblich so großen Menge Wasserstoffs (414 ccm) will Walther Löb schließen, daß durch den gebildeten Wasserstoff die Kohlensäure reduziert wird.

Diese Beobachtungen Löbs sind, wie wir uns erst neuerdings wieder überzeugten, völlig unrichtig, und seine Mühe ist vergeblich, sie durch Ausweichungen verdecken zu wollen. Daß solche Spuren von Wasserstoff — und es ist ja noch fraglich, ob es überhaupt Wasserstoff ist — bei den chemischen Reaktionen nicht in Betracht gezogen werden

---

[1]) Julius Stoklasa, Johann Šebor und Wenzel Zdobnický, diese Zeitschr. 41, 333, 1912.

[2]) Wir haben deshalb eine so hohe Temperatur gewählt, weil bei dieser Temperatur die photochemischen Prozesse vor sich gegangen sind.

können und daß von einer Reduktion der Kohlensäure durch freien Wasserstoff nicht die Rede sein kann, liegt klar auf der Hand.

Was die Rotation betrifft, so liegt eine Drehung 0,15° schon sehr nahe der Fehlergrenze; die Erfahrung, daß synthetisch inaktive Gemische von Zuckerarten entstehen, ist auch uns bekannt. Wir betonen nochmals, daß wir einfach unsere Beobachtungen den Protokollen gemäß wiedergegeben haben.

In bezug des Umrechnungsfaktors verweisen wir auf Tollens Handbuch der Kohlenhydrate S. 6.

Mit unseren heutigen Auslassungen glauben wir somit, die Polemik mit Herrn Walther Löb beendigt zu haben.

Das Fischsperma als Nahrungsmittel für den Menschen.

Von

J. König und J. Großfeld.

(Aus der Landwirtschaftlichen Versuchsstation in Münster i. W.)

(Eingegangen am 7. Juli 1913.)

Das Fischsperma[1]), das, ebenso wie der Fischrogen, auch vom Menschen (z. B. im Hering) mitgenossen wird[2]), hat in den letzten Jahren dadurch ein besonderes Interesse erweckt, daß A. Kossel[3]) in den aus Lachssperma von Miescher[4]) zuerst dargestellten basischen Eiweißkörpern, den Protaminen, die am einfachsten gebauten Proteine kennen lehrte.

Die zuerst im Lachssperma gefundenen Protamine wurden in der Folge in den Testikeln mehrerer Fische nachgewiesen und nach der betreffenden Fischart als Salmin, Clupein, Sturin usw. bezeichnet.

Andere Fische enthalten im Sperma statt der Protamine Verbindungen derselben mit Nucleinsäuren, die Histone, z. B. Dorsch, Karpfen usw.

---

[1]) Bei der Gewinnung von Fischsperma wie Fischrogen hat Herr Dr. A. Thienemann, Privatdozent an der Kgl. Universität und Biologe an der Landw. Versuchsstation, bereitwillige Hilfe geleistet, wofür ihm hier besonderer Dank ausgesprochen sei.

[2]) Besonders die Testikeln von gesalzenen Heringen werden vielfach verzehrt, die von Bratheringen sind gebraten sehr schmackhaft, das bekannte Gericht Heringssalat wird meistens mit „Heringsmilch" zubereitet.

[3]) A. Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 176, 1897 und folgende Bände.

[4]) Miescher, Verhdl. d. naturf. Ges. in Basel 4, 1. Heft, 153, 1874. — Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 7, 376, 1874.

Da sich diese Histone ihrerseits wiederum sehr leicht mit anderen Eiweißkörpern verbinden, wird die Ansicht Kossels, daß die Proteine einen protaminähnlichen Kern basischer Natur enthalten, an den sich die übrigen Eiweißbausteine angelagert haben, verständlich.

In der Tat sind ja auch in fast allen Proteinen die Spaltungsprodukte jener Protamine, Arginin, Lysin und das von Kossel aus Protamin zuerst gewonnene Histidin, wenigstens das eine oder das andere, nachgewiesen worden.

1. Allgemeine Zusammensetzung des Fischspermas.

Auf seine allgemeine Zusammensetzung als Nahrungsmittel ist das Fischsperma nur wenig untersucht worden. J. König und A. Splittgerber[1]) geben dafür folgende Zusammensetzung an:

Sperma von	In der lufttrocknen Substanz:				In der Trockensubstanz:		
	Wasser %	Stickstoff %	Fett %	Asche %	Stickstoff %	Fett %	Asche %
Hering . . .	9,75	13,80	10,60	4,22	15,29	11,74	4,68
Karpfen . .	5,56	12,22	18,18	0,80[1])	12,94	19,25	0,85[2])

Nach Heinr. Gerhartz[3]) ist die Zusammensetzung von reifem und unreifem Lachssperma folgende:

Gegenstand	Gewicht g	Wasser %	Stickstoff %	Mineral-bestandteile %
Unreife Lachshoden . . .	43,2	81,3	2,1	4,0
Reife Lachshoden . . .	269,0	77,9	3,4	2,3

Wir erhielten für das Sperma von Hering und Karpfen folgende Ergebnisse:

---

[1]) Bedeutung der Fischerei für die Fleischversorgung i. Deutschen Reich, S. 106.

[2]) Der niedrige Wert stimmt wenig mit den übrigen und ist unwahrscheinlich.

[3]) Handb. d. Biochemie, Jena, 3, I, 353, 1910.

Sperma von	Natürliche Substanz: Wasser %	Gesamt-stickstoff %	Stickstoff-substanz %	Fett %	Asche %	Trockensubstanz: Gesamt-stickstoff %	Stickstoff-substanz[1] %	Fett %	Asche %
Hering . . .	75,62	4,12	17,75	4,42	2,21	16,88	72,82	18,18	9,06
Karpfen . .	78,47	3,07	16,02	3,17	2,34	14,25	73,96	14,74	11,30

Dem Gebrauche des Fischspermas als Nahrungsmittel scheint die Angabe W. H. Thompsens[2]), daß die Protamine deutlich giftige Wirkungen zeigen, entgegenzustehen. Da aber Heringsmilch tatsächlich ohne Schaden genossen wird, so sind die Protamine entweder nur im freien Zustande als solche giftig und nicht im Sperma, wo sie als gebunden angenommen werden können, oder der menschliche Magen besitzt für gewisse Spermasorten Mittel, jene toxischen Eigenschaften unschädlich zu machen.

2. Bestimmung und Trennung der Stickstoffverbindungen des Fischspermas.

Zur eingehenderen Untersuchung des Fischspermas bedienten wir uns in der Aufarbeitung der Rohstoffe teils des von Kossel zur Gewinnung der Protamine angegebenen Verfahrens[3]), teils änderten wir, da es uns weniger auf die Gewinnung der Protamine als überhaupt auf die Zusammensetzung und die Bestimmung des Nährwertes des Fischspermas ankam, jenes etwas ab. Wir verfuhren bei Heringssperma in folgender Weise:

Die Testikel wurden mittels einer Fleischmühle möglichst zerkleinert, mit Wasser zu einer milchigen Flüssigkeit verrührt und diese durch Kolieren von den gröberen Bestandteilen möglichst befreit. Das milchige Kolat schied dann auf Zusatz

[1]) Die Stickstoffsubstanz läßt sich hier nicht in der üblichen Weise durch Multiplikation des Stickstoffs mit 6,25 berechnen, sondern muß aus der Differenz 100 — (Wasser + Fett + Asche) angenommen werden, weil die Protamine einen höheren Stickstoffgehalt (25 bis 30 %) als die Proteine besitzen.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 29, 1, 1900.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 178, 1896/97.

von etwas Essigsäure einen flockigen Niederschlag aus, der sich leicht absetzte. Durch häufiges Dekantieren konnte derselbe leicht vollständig ausgewaschen werden.

Die so erhaltene Masse wurde nun mehrmals mit Alkohol ausgezogen, hierauf mit Äther behandelt und schließlich getrocknet. Die trockene „Spermasubstanz" wurde alsdann, um auch die letzten Fettreste zu entfernen, mehrere Tage im Soxhlet-Apparat mit Äther extrahiert.

Die sämtlichen alkoholischen und ätherischen Auszüge wurden abdestilliert, die Fette hierbei abgeschieden, wieder in Äther aufgenommen und der zurückbleibenden wässerigen Flüssigkeit durch Ausschütteln vollständig entzogen. Hierbei zeigte sich, daß die Fette, nur bei Gegenwart von Alkohol von Äther glatt gelöst wurden, eine Erscheinung, die zweifellos durch die kolloidale Beschaffenheit der Masse, ähnlich wie bei Milch, bedingt ist.

Die gewonnenen Fette wurden hierauf durch einen Kohlendioxydstrom im kochenden Wasserbade von der letzten Spur Feuchtigkeit befreit und in einer Atmosphäre letztgenannten Gases erkalten gelassen und aufbewahrt.

Die wässerigen Auszüge der Spermasubstanz wurden auf dem Wasserbade konzentriert, die sich hierbei abscheidenden geringen Proteinmengen als „Spermaalbumin" mittels Alkohol und Äther von Wasser und Fett befreit.

Das Filtrat von Albumin wurde auf ein Volumen von 500 ccm gebracht und, um Fäulnis zu verhindern, mit einigen Tropfen Chloroform versetzt.

Von 240 Stück[1]) laichreifen Heringen aus dem Kaiser-Wilhelm-Kanal waren 132 Stück Rogener, 108 Milchener; letztere lieferten 1,573 kg Heringssperma; hiervon wurden 239 g für die allgemeine Untersuchung verwendet. Die übrigbleibenden 1,334 kg, wie oben beschrieben, verarbeitet. Sie lieferten 170 g entfettete Spermasubstanz.

Das Sperma von 2 Karpfen im Gewichte von zusammen 6,06 kg betrug 677 g; hiervon wurden für allgemeine Untersuchungen 92 g verwendet, der Rest auf Spermasubstanz, Fett und Extraktivstoffe verarbeitet.

---

[1]) Nach dem Ausnehmen gewogen = 24 kg.

Beim Verreiben des Karpfenspermas mit Wasser wurde das letztere begierig aufgesaugt; es entstand jedoch keine milchige Flüssigkeit, sondern die Masse ballte sich gallertartig zusammen, eine Erscheinung, die ihren Grund wahrscheinlich in der Frische des Materials sowie darin hatte, daß die Fische äußerst laichreif waren (Mitte Juni!). Da also ein Kolieren nicht möglich war, zerkleinerten wir das mit Wasser versetzte Karpfensperma mittels einer Fleischmühle nach Möglichkeit, schwemmten in Wasser auf und versetzten mit Essigsäure, wobei die Quellung zurückging. An Spermasubstanz wurden 53 g, an Albumin 0,91 g erhalten; letzteres enthielt 24,6 % Stickstoff, war also noch mit anderen Stickstoffverbindungen stark verunreinigt.

Hiernach verteilt sich der Stickstoff im Sperma wie folgt:

Sperma von	In der natürlichen Substanz: Stickstoff in Form von				In der Trockensubstanz: Stickstoff in Form von			
	Gesamt-stickstoff	Sperma-substanz	Albumin	Basen + Amino-säuren	Gesamt-stickstoff	Sperma-substanz	Albumin	Basen + Amino-säuren
Hering . . .	4,12	3,49	0,06	0,57	16,88	14,28	0,25	2,37
Karpfen . . .	3,07	1,76	0,04	1,17	14,25	8,12	0,19	5,44

Wie ersichtlich, sind die Albuminmengen sehr gering. An Stickstoff enthielt das Rohalbumin aus Heringssperma 14,24 %, die Spermasubstanz (trocken, aschefrei) 18,43 %, die aus Karpfensperma 16,54 %.

Da nach J. König und A. Splittgerber[1]) das Fischfleisch ebenso wie das warmblütiger Tiere Fleischbasen, u. a. Kreatin, Kreatinin und Xanthinbasen, teilweise in großer Menge enthält, so haben wir auch hierauf im Sperma unsere Aufmerksamkeit gerichtet und zunächst in den von Albumin befreiten auf 500 ccm aufgefüllten Lösungen folgenden Gehalt festgestellt:

Auszug von	Stickstoff g	Abdampf-Rückstand g	Asche g	Organische Trocken-substanz g
Heringssperma . .	7,58	56,80	8,40	48,40
Karpfensperma . .	6,85	52,03	8,89	43,14

[1]) J. König und A. Splittgerber, Bedeutung der Fischerei für die Fleischversorgung, S. 127.

Je $^{2}/_{5}$ der Gesamtmenge fällten wir alsdann nach Baur und Barschall[1]) in schwefelsaurer Lösung mit phosphorwolframsaurem Natrium, ließen, um möglichst vollständige Fällung zu erzielen, mindestens 48 Stunden stehen, nutschten dann ab und wuschen mit 5%iger Schwefelsäure nach.

Das Filtrat wurde mit Bariumcarbonat abgestumpft, mit Bariumhydroxyd alkalisiert, und dann durch Einleiten von Kohlendioxyd vom überschüssigen Barium befreit. Um das durch die überschüssige Kohlensäure als Bicarbonat gelöste Barium noch zu entfernen, dampften wir auf dem Dampfbade ein und filtrierten ab, wobei wir das Filtrat auf ein Volumen von 200 ccm brachten. Dieses enthielt neben großen Salzmengen, von den Reagenzien herrührend, die nicht gefällten Aminosäuren[2]).

Den Phosphorwolframsäure-Niederschlag zerlegten wir mit Bariumhydroxyd, entfernten, wie oben, den Überschuß des letzteren mit Kohlendioxyd. In der erhaltenen Lösung schieden wir dann nach Micko[3]) die Purinbasen mit einem Gemisch von Natriumbisulfit und Kupfersulfat ab.

Das Kreatinin wird hierdurch nicht gefällt und bleibt im Filtrat, das durch Schwefelwasserstoff entkupfert und dann zur Trockne verdampft wurde. Der Trockenrückstand wurde mehrmals mit Alkohol von 95% in der Hitze ausgezogen; die alkoholischen Auszüge wurden schwach alkalisch gemacht, vom ausgeschiedenen Alkalisulfat abfiltriert und mit alkoholischer Chlorzinklösung versetzt. Der zuerst entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat eingeengt und zum Krystallisieren hingestellt. In der Tat erschienen, wenn auch erst nach Wochen, die charakteristischen Chlorzink-Kreatinin-Krystalle, Nadeln, teilweise zu büschelförmigen Drusen vereinigt (vgl. Tafel I Fig. 1). Beim Heringssperma waren diese am schönsten; beim Karpfensperma zeigten sich mehr knollenförmige Gebilde, jedenfalls durch die geringere Reinheit des Kreatinins bedingt. Einen weiteren Beweis für die Identität der Ausscheidung mit

---

1) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 24, 552, 1906.

2) Außerdem noch geringe Mengen Barium, wahrscheinlich in Bindung mit den Aminosäuren.

3) Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußm. 5, 193, 1902; 6, 781, 1903.

Kreatininsalz lieferte die bekannte Reaktion von Jaffé[1]) mit alkalischer Pikrinsäure, mit der Kreatinin auch in sehr großer Verdünnung noch eine granatrote Färbung liefert[2]). Auch die Reaktion von Weyl[3]) mit Nitroprussidnatrium trat ein, aber schwach, entsprechend ihrer geringeren Empfindlichkeit.

Die nach Micko durch Natriumbisulfit und Kupfersulfat abgeschiedenen Xanthinbasen wurden, um das Kupfer zu entfernen, in Salzsäure aufgeschwemmt und durch Schwefelwasserstoff unter Druck zerlegt. Nach Entfernung des abgeschiedenen Schwefelkupfers durch Filtration und des gelösten Schwefelwasserstoffs durch Kochen machten wir die Lösung ammoniakalisch und fällten die Basen mit ammoniakalischer Silberlösung im Überschuß.

Da das Xanthinsilber ($C_5H_4N_4O_2 . Ag_2O$) 56,2 °/₀ Ag und 14,6 °/₀ N enthält, bedienten wir uns desselben anfangs zur Feststellung der Xanthinbasen.

Doch ist zu beachten, daß bei Guanin, Adenin, Hypoxanthin besonders der Stickstoffgehalt höher ist; es enthält nämlich freies Xanthin 36,9, Hypoxanthin 41,2, Guanin 46,4, Adenin 51,9 Prozente Stickstoff. Da es sich indes in der vorliegenden Untersuchung um vergleichende Werte handelt, haben wir die gefundenen Größen auf Xanthin berechnet.

Wir fanden:

Sperma von	Xanthinsilber	Darin Silber[4]):		Darin Stickstoff:	
		gefunden	berechnet	gefunden	berechnet
	g	g	g	g	g
Hering	0,5230	0,3054	0,2939	0,0870	0,0764
Karpfen . . .	0,8795	0,4379	0,4943	0,1797	0,1285

Einen Teil des Xanthinsilbers aus Karpfensperma zerlegten wir, versuchsweise in Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefel-

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 399, 1886.

[2]) In konzentrierter Lösung gibt auch Pikrinsäure allein mit NaOH Rotfärbung, doch geht diese im Gegensatz zu der mit Kreatinin hervorgerufenen beim Verdünnen mit Wasser wieder in Gelb über. Auch H_2S, $CH_3 . CO . CH_3$ können Täuschung veranlassen, diese Stoffe waren aber in den untersuchten Präparaten nicht vorhanden.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **11**, 2175, 1878.

[4]) Zur Silberbestimmung wurde die Substanz mit Schwefelsäure verbrannt, nach dem Erkalten mit Wasser verdünnt und mit Salzsäure das Silber ausgefällt.

wasserstoff in Schwefelsilber und freie Xanthinbasen; das abgeschiedene Silber betrug von 0,2760 g lufttrocknen freien Basen 0,3463 g (berechnet 0,3414). In den freien Basen betrug der Stickstoff-Gehalt 40,7 %; qualitativ gaben die Basen, mit Salpetersäure eingedampft und mit Natronlauge betupft, charakteristische Rotfärbung. Alle diese Befunde lassen keinen Zweifel an der Identität der abgeschiedenen Stoffe mit den bekannten Purinbasen.

Auf Grund vorstehender Ergebnisse verteilt sich also der Basenstickstoff in den Extrakten von Herings- und Karpfensperma etwa folgendermaßen:

Es enthielt:

Sperma von	Wasser %	Gesamt-stickstoff %	Extrakt-stickstoff %	Als Basen-stickstoff gefällt %
Hering	75,62	4,12	0,57	0,35
Karpfen . . .	78,47	3,07	1,17	0,66

Die Hauptmenge des nicht durch Phosphorwolframsäure gefällten Stickstoffs besteht der Hauptsache nach aus Aminosäuren.

Zwar gelang es nicht, in dem bekannten Apparate von C. Böhmer[1]) mit Natriumnitrit und verdünnter Schwefelsäure nennenswerte Mengen Stickstoff in Freiheit zu setzen.

Auch das Verfahren von Neuberg und Kerb[2]), die Aminosäuren mit Mercuriacetat und Soda unter Zusatz von Alkohol auszufällen, erwies sich im vorliegenden Falle bei den großen vorhandenen Salzmengen, wegen der schlechten Filtrierbarkeit des Niederschlages, die wahrscheinlich durch Verbindungen des Quecksilbers mit Begleitstoffen der Aminosäuren unbekannter Art verursacht war, als nicht zweckmäßig; zudem hätte bei den vorhandenen großen Salzmengen das Auswaschen des Niederschlages viel Zeit in Anspruch genommen. Bei einer Probe indes führten wir das Verfahren mit Erfolg durch und konnten nach Abscheidung des Quecksilbers durch wiederholte Krystallisation Krystalle erhalten, die mit denen des Leucins und Tyrosins große Ähnlichkeit besaßen.

---

1) Von J. König zweckmäßig geändert.

2) Diese Zeitschr. **40**, 498, 1912.

Bequemer erwies sich das von E. Fischer angegebene und auch von Baur und Barschall[1]) bei der Untersuchung des Fleischextraktes auf Aminosäuren angewendete Verfahren der Ausschüttelung der zu untersuchenden Lösung mit einer ätherischen Lösung von β-Naphthalinsulfochlorid während 18 Stunden; hierbei verbindet sich die Sulfogruppe mit der Aminogruppe nach folgendem Schema:

$$\underset{\text{Amino-säure}}{S.NH_2} + C_{10}H_7.SO_2.Cl = S.NH.SO_2.C_{10}H_7 + HCl, \text{ z. B.:}$$

Naphthalinsulfochlorid

$$\underset{\text{Glykokoll-Na}}{CH_2.NH_2.COONa} + C_{10}H_7.SO_2.Cl + NaOH$$
$$= CH_2.NH.SO_2.C_{10}H_7.COONa + NaCl + H_2O.$$

Wegen der entstehenden Salzsäure sollen die Lösungen schwach alkalisch reagieren, jedoch nicht so stark, daß durch Nebenreaktionen das Reagens verbraucht wird. Diese Naphthalinsulfo-Verbindungen der Aminosäuren sind in schwachen Säuren schwer löslich, die Na-Salze geben daher beim Ansäuern eine Fällung, und zwar von öliger Beschaffenheit, die allmählich fest und krystallinisch wird; ein geringer Teil bleibt jedoch in Lösung, nämlich in 100 ccm 0,002 g N[2]), die man als Korrektur in Anrechnung bringen kann. Den Niederschlag kann man zur N-Bestimmung nach Kjeldahl verbrennen. Wir erhielten nach dieser Methode höhere Werte als mit salpetriger Säure, doch wurde nicht aller Stickstoff umgesetzt.

Die besten Ergebnisse erzielten wir nach der Formolmethode von S. P. L. Sörensen[3]), deren sich die Ärzte bereits allgemein zur Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs z. B. im Harn bedienen. Das Verfahren beruht darauf, daß die basische Aminogruppe in den Aminosäuren durch Formaldehyd eine solche Änderung erfährt, daß die vorher fast neutrale Aminosäure deutlich sauer wird. Die Reaktion verläuft z. B. für Glykokoll in folgender Weise:

$$\underset{\text{neutral}}{CH_2(NH_2)COOH} + CH_2O = \underset{\text{sauer}}{CH_2(N:CH_2)COOH} + H_2O.$$

Das Verfahren ist daher zunächst nur anwendbar für neutrale Aminoverbindungen. Viele Aminosäuren reagieren

---

[1]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 24, 552, 1906.

[2]) Nach Baur und Barschall, l. c.

[3]) Diese Zeitschr. 7, 45, 1908.

aber nicht ganz neutral, sondern z. B. gegen Phenolphthalein sauer.

Andererseits sind Formolverbindungen als ziemlich schwache Säuren in wässeriger Lösung stark ionisiert, so daß man mit Phenolphthalein weiter als bis zur beginnenden Rötung zu titrieren hat. Ferner verhalten sich Ammoniumsalze, deren Ammoniak durch Formol in Hexamethylentetramin verwandelt wird, analog den Aminosäuren. Schließlich wirken bei der Titration schwache anorganische Säuren, wie Kohlensäure, Phosphorsäure störend.

Alle diese Störungen kann man aber ausschalten, wenn man etwa in folgender Weise verfährt:

50 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit[1]) werden in einem Kolben von 100 ccm mit 1 ccm 0,5 % iger Phenolphthaleinlösung und 10 ccm 20 % iger Bariumchloridlösung versetzt. Hierauf wird gesättigte Barytlauge bis zur Rotfärbung und dann noch ein Überschuß von etwa 5 ccm zugefügt. Nach dem Auffüllen auf 100 läßt man alsdann 15 Minuten stehen und filtriert durch ein trockenes Filter.

50 ccm des rotgefärbten Filtrates neutralisiert man genau gegen Lackmuspapier (bis zur violetten Farbe)[2]). Diese dienen zur Formoltitration.

Erforderliche Lösungen:

1. $^n/_5$-Baryt- oder Natronlauge (carbonatfrei);
2. $^n/_5$-Salzsäure;
3. 0,5 g Phenolphthalein in 100 ccm verd. Alkohol (50 %);
4. 30 bis 40 % ige Formollösung bis zu schwacher Rosafärbung mit Phenolphthalein neutralisiert;
5. Vergleichslösung: 50 ccm ausgekochtes Wasser werden mit 20 ccm Formol und 5 ccm $^n/_5$-Natronlauge sowie 1 oder 2 ccm Phenolphthaleinlösung versetzt und mit $^n/_5$-Salzsäure schwach rosa titriert; dann werden noch

[1]) Ist diese stark konzentriert, so nimmt man entsprechend weniger, und umgekehrt.

[2]) Der Farbenumschlag bei Lackmus ist nicht sehr scharf, ein Umstand, der eine gewisse Ungenauigkeit des Verfahrens bedingt; doch zeigten für die vorliegenden Zwecke die Resultate hinreichende Übereinstimmung.

3 Tropfen Barytlauge zugegeben, so daß starke Rotfärbung eintritt.

Titration der Aminosäurenlösung:

50 ccm obiger Aminosäurenlösung werden, nachdem man 20 ccm Formol zugefügt hat, bis zur Farbstärke der Vergleichslösung titriert; dann werden noch einige Kubikzentimeter Lauge zugegeben und wieder so viel $^{n}/_{5}$-Salzsäure, daß die Farbe schwächer als die Vergleichslösung erscheint. Schließlich wird abermals $^{n}/_{5}$-Lauge zugefügt, bis die Farbe wieder erreicht ist. Der Formolstickstoff berechnet sich aus der Gleichung:

$$N = (^{n}/_{5}\text{-NaOH} - {^{n}/_{5}}\text{-HCl}) \times 2{,}8 \text{ mg}.$$

Man kann die Titration zur Kontrolle mit etwa 25 oder 30 ccm des Restes des, wie oben beschrieben, gewonnenen Filtrates wiederholen, hat dann aber auch die Vergleichslösung auf dieses Volumen einzustellen[1]).

Ist Ammoniak vorhanden, so muß dieses nach einer der bekannten Methoden für sich bestimmt und dessen Stickstoff vom Aminosäurenstickstoff in Abrechnung gebracht werden.

Oder man versetzt in einem 100-ccm-Kölbchen 50 ccm der Flüssigkeit mit Bariumchlorid und Bariumhydroxyd, füllt auf 100 ccm auf, entnimmt 80 ccm (= 40 ccm ursprünglicher Lösung) und treibt das Ammoniak im Vakuum aus, den Rückstand im Kolben bringt man mit etwas Salzsäure in Lösung, leitet unter Evakuierung kohlensäurefreie Luft durch, neutralisiert genau mit kohlensäurefreier Natronlauge unter Benutzung von empfindlichem Lackmuspapier bis zur schwachroten Farbe und zuletzt mit $^{n}/_{5}$-Salzsäure bis zur neutralen Reaktion. In der ammoniakfreien Lösung werden die Aminosäuren wie vorstehend bestimmt.

Nach diesem Formolverfahren fanden wir in den nicht gefällten Aminosäuren von Karpfensperma[2]) 0,515 g Formol-

---

[1]) Eine bessere Kontrolle gewährt jedoch eine Wiederholung der ganzen Operation (Neutralisation gegen Lackmus, Ausfällen mit Baryt usw.) mit weiteren 50 ccm der ursprünglich zu untersuchenden Flüssigkeit.

[2]) Die Aminosäurenlösung vom Heringssperma war in den Versuchen nach den vorhergehenden Verfahren aufgebraucht worden.

stickstoff, während die Kjeldahl-Stickstoffbestimmung 0,519 g ergeben hatte.

Zusammenstellung der Ergebnisse bei der Bestimmung des Aminosäurenstickstoffs:

Sperma von	Stickstoff in Basen + Aminosäuren %	Nicht gefällt %	Bestimmt als Aminosäuren-Stickstoff: mit $C_{10}H_7SO_2Cl$ %	mit Formol %
Hering	0,567	0,221	0,023	—
Karpfen	1,179	0,519	0,052	0,515

In Prozenten des in Form von Basen und Aminosäuren enthaltenen Stickstoffs wurden also gefunden:

Sperma von	Mit Phosphorwolframsäure gefällt: Insgesamt %	Xanthinbasen %	Sonstige Basen %	Nicht gefällt: Insgesamt %	mit $C_{10}H_7SO_2Cl$ %	mit Formol %
Hering . . .	62,3	1,74	60,6	31,7	4,10	—
Karpfen . .	55,6	2,29	53,3	44,4	4,45	43,8

Die auf oben beschriebene Weise dargestellte Spermasubstanz hatte folgende allgemeine Zusammensetzung:

Spermasubstanz von	Wasser %	Asche %	In der aschefreien Trockensubstanz: Protein %	Stickstoff %	Phosphor [1]) %	Schwefel [1]) %
Hering . . .	10,57	3,43	86,00	18,43	4,46	0,53
Karpfen . .	2,52	2,81	84,67	16,54	3,74	0,20

Auffällig in den angegebenen Werten sind die hohen Zahlen für Phosphor.

[1]) Die Bestimmung von Phosphor und Schwefel geschah durch Schmelzen der Substanz mit Alkalihydroxyd im Nickeltiegel unter allmählicher Zugabe von Salpeter, bis die Gasentwicklung aufhörte. Um den Schwefelgehalt des Leuchtgases auszuschalten, nahmen wir die Schmelze über einer Spiritusflamme vor.

Der Schmelzkuchen ließ sich in den meisten Fällen leicht aus dem Tiegel entfernen; er wurde angesäuert und die Schwefelsäure als Bariumsulfat bestimmt, während der Phosphor nach der bekannten Molybdänmethode bestimmt wurde.

Um die **Protamine** zu gewinnen, unterwarfen wir die Spermasubstanz 3 mal je einer $^{1}/_{4}$ stündigen Ausschüttelung mit 1 $^{0}/_{0}$ iger Schwefelsäure, fällten das Protamin mit der 3 fachen Menge Alkohol und reinigten es durch mehrmaliges Auflösen und Fällen, sowie durch Überführen in die Pikrinsäureverbindung.

Die erhaltene Menge war nur gering. Immerhin untersuchten wir diese auf Stickstoff und Schwefelsäure. Außerdem stellten wir den Stickstoffgehalt der extrahierten, wasser- und säurefreien Substanz fest:

Spermasubstanz von	Angewendete Menge g	Darin Stickstoff (in org. Trockensubstanz) %	Nach der Extraktion: Stickstoff im Rückstande (H_2O-, Asche-, u. H_2SO_4-frei) %	Extrahierte Substanz g	darin Stickstoff %	darin H_2SO_4 %
Hering . . .	50	18,43	18,34	0,3040	21,40	19,6
Karpfen . .	25	16,54	17,28	0,6600	13,61	24,7

Der größte Teil des Protamins war also jedenfalls der Extraktion entgangen; außerdem ist beim Karpfensperma, wahrscheinlich neben dem Histon[1]), ein Stoff extrahiert worden, der sich durch geringen Stickstoffgehalt unterscheidet. Hierfür sprach auch die eigenartig ölig-schleimige Beschaffenheit des Körpers.

Die auf diese Weise extrahierte Spermasubstanz hydrolysierten wir mit der 9 fachen Gewichtsmenge 33 $^{0}/_{0}$ iger Schwefelsäure durch 14 stündiges Kochen am Rückflußkühler[2]), nachdem zuvor die Substanz durch Erwärmen auf dem Wasserbade in Lösung gebracht war.

In der gewonnenen Lösung wurde der größte Teil der Schwefelsäure durch Erwärmen mit Bariumcarbonat abgestumpft und das Filtrat auf $^{1}/_{2}$ l aufgefüllt.

Von dieser Menge fällten wir je 200 ccm mit Phosphorwolframsäure aus, entfernten das Fällungsmittel, wie bei der Fällung der wässerigen Extrakte und bestimmten die gefällten und nicht gefällten Stickstoffmengen.

---

[1]) Karpfensperma enthält statt des Protamins ein Histon, wie bereits oben gesagt.

[2]) Nach Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 168, 1900/01.

Außerdem wurden in der ursprünglichen Lösung Ammoniakbestimmungen ausgeführt.

Übersicht.

Spermasubstanz von	In der Hydrolysenflüssigkeit waren					
	Gesamtstickstoff	nicht gefällt	gefällt	davon Ammoniak	Diaminoverbindungen + Purinbasen	Sonstiges (Huminstickstoff usw.)
Hering .	1,056	0,367	0,689	0,047	0,317	0,325
Karpfen .	0,729	0,288	0,441	0,067	0,371	0,154

Die Ammoniakbestimmung wurde durch Destillation mit Magnesia vorgenommen.

In der Lösung der durch Phosphorwolframsäure gefällten Stoffe wurden wie oben S. 338ff. die Xanthinbasen bestimmt.

Die Resultate der Xanthinbestimmungen waren folgende:

Spermasubstanz von	Angewendete Menge g	Darin Xanthinstoffe g	Darin Stickstoff[1])	
			gefunden	berechnet
Hering	8,0	0,1355	0,0473	0,0500
Karpfen . . .	6,0	0,2480	0,0921	0,0915

Die Reaktion mit Salpetersäure-Natronlauge für Xanthine fiel ebenfalls deutlich positiv aus.

Hiernach kann es keinem Zweifel unterliegen, wie auch anderweitige eingehendere Untersuchungen dargetan haben[2]), daß die Spermasubstanz echte Nucleine enthält, wofür auch der hohe Phosphorgehalt S. 344 spricht.

Im Filtrat von Xanthinkupfer stellten wir, um ein Maß für die Menge der Diaminoverbindungen zu erhalten, den Gesamtstickstoff fest und erhielten jene oben mitgeteilten Werte.

In einem Teil der Hydrolysenflüssigkeit von Karpfen-Spermasubstanz (entsprechend 2 g) schieden wir außerdem die Hexonbasen mit Phosphorwolframsäure ab und isolierten das

[1]) Die Werte für Silber fielen in diesem Falle zu niedrig aus; der Grund ließ sich wegen zu gering erhaltener Mengen Xanthinsilber nicht aufklären.

[2]) Untersuchungen Kossels über Nucleine, Zeitschr. f. physiol. Chem. 3, 284, 1879 und folgende Bände.

Histidin, charakterisiert durch seine Fällbarkeit mit ammoniakalischer Silberlösung, ein Niederschlag, der im Überschuß des Ammoniaks aber wieder löslich ist, sowie durch seine Farbstoffbildung mit Diazobenzolsulfosäure, das Arginin, durch die Krystallform seines Nitrates gekennzeichnet. Die Gewinnung von Lysin gelang wegen der angewendeten geringen Substanzmenge nicht in dem Maße, daß die Base einwandfrei nachgewiesen werden konnte. Immerhin zeigten gewonnene Krystalle der Pikrinsäureverbindung Ähnlichkeit mit den erwarteten.

Auf Aminosäuren untersuchten wir auch hier mit salpetriger Säure, β-Naphthalinsulfochlorid und nach der Formolmethode. Letztere lieferte die besten Ergebnisse. Wir wendeten diese Methode sowohl auf die gesamte Hydrolysenflüssigkeit als auch auf den mit Phosphorwolframsäure nicht gefällten Teil an:

Hydrolysenflüssigkeit von	Stickstoff nach Kjehldahl in 200 ccm	Formol-stickstoff	Durch Formol nicht titrierbar
Heringsspermasubstanz . .	1,057	0,475	0,582
Karpfenspermasubstanz . .	0,729	0,454	0,275
Desgl. nach Entfernung der Basen mit Phosphorwolframsäure:			
Aminosäuren von Hering .	0,367	0,376	(−0,009)
" " Karpfen.	0,288	0,246	0,042

Über die prozentuale Stickstoffverteilung nach der Hydrolyse gibt nachstehende Zusammenstellung Auskunft:

In Prozenten des Stickstoffs wurden mit Phosphorwolframsäure						
	gefällt:			nicht gefällt:		
Sperma-substanz von	Gesamt %	Xanthin-basen %	Am-moniak %	Gesamt %	Bestimmt mit Formol %	Bestimmt mit $C_{10}H_7SO_2Cl$ %
Hering .	65,27	4,49	4,43	34,73	(35,6)	5,70
Karpfen .	60,48	12,63	9,18	39,52	33,7	8,12

3. Untersuchung des Fischspermafettes.

Die bei der Behandlung der Proteine aus Fischsperma mit Alkohol und Äther gewonnenen Fette bildeten nach dem Trocknen im Kohlendioxydstrome eine zähe, dunkelbraune Masse. Beim Erwärmen wurde dieses jedoch dünnflüssig und

ließ sich im Dampftrockenschrank bei 98° durch ein trockenes Filter filtrieren. Das durchaus homogene Filtrat, nach dem Erkalten wieder von zäher Beschaffenheit, diente zur Bestimmung der Jodzahl, Verseifungszahl, des Lecithins und des Cholesterins.

Da es sich nicht vermeiden ließ, die Fette bei ihrer Gewinnung längere Zeit mit der Luft in Berührung zu lassen, dürften zwar die Jodzahl und Verseifungszahl eine gewisse Veränderung erlitten haben, aber der Lecithinphosphor- und Cholesteringehalt im wesentlichen unverändert geblieben sein[1]).

Zur Bestimmung der Jodzahl bedienten wir uns des Verfahrens von Wijs[2]).

Die Verseifungszahl stellten wir in üblicher Weise fest; doch zeigte sich, daß bei Benutzung von Phenolphthalein als Indicator der Farbumschlag deutlicher erkennbar wurde, wenn die Seifenlösung vor der Titration mit Alkohol verdünnt worden war.

Auf diese Weise wurden folgende Jodzahlen und Verseifungszahlen gefunden:

Spermafett von	Substanzmenge g	Verbrauchte Menge Jod g	Jodzahl	Substanzmenge g	KOH mg	Verseifungszahl
Hering .	0,2270	0,2927	**129**	0,9025	188,4	**209**
Karpfen .	0,2070	0,2170	**105**	0,8355	152,4	**182**

Die hohe Jodzahl weist auf einen hohen Prozentgehalt des Spermafettes an ungesättigten Verbindungen (Ölsäuren, Cholesterin usw.) hin.

Zum Nachweis des Lecithins beschränkten wir uns, da andere ätherlösliche Phosphorverbindungen als Lecithin nicht

[1]) Das Lecithin gilt als leicht zersetzlich, doch ist dieses für den vorliegenden Fall belanglos, da ja sowohl die phosphorhaltigen (Lecithinphosphorsäure, Phosphorsäure) wie die stickstoffhaltigen (Cholin, Trimethylamin) Zersetzungsprodukte, als Lecithin-P bzw. als Lecithin-N mitbestimmt wurden. Von größerer Bedeutung ist die Zersetzlichkeit des Lecithins, wenn es darauf ankommt, dasselbe rein zu isolieren oder aus nicht fettartigen Stoffen abzuscheiden.

[2]) Vgl. J. König, Die Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe, Berlin 1906, S. 532.

bekannt sind, auf die Bestimmung des Phosphorgehaltes des Fettes, führten jedoch, um eine gewisse Kontrolle zu besitzen, gleichzeitig in einem kleineren Teile eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl aus.

Bei der Phosphorbestimmung erwies sich folgendes Verfahren als vorteilhaft:

Eine gewogene Menge Substanz (0,5 bis 1 g) wurde in einem Nickeltiegel mit einigen Stückchen von reinem Kaliumhydroxyd (3 bis 5 g) versetzt, mit verdünntem Alkohol zuerst auf dem Wasserbade, hierauf im Trockenschrank eingedampft. Hierbei tritt einerseits vollständige Verseifung des Fettes ein, während andererseits die Vermischung der Seife mit dem überschüssigen Alkali eine so vollständige wird, daß Phosphorverluste bei der Verbrennung nicht zu befürchten sind.

Die Veraschung geschieht über möglichst kleiner Flamme unter allmählichem Zusatz geringer Mengen Natriumnitrat oder Natriumnitrit, schließlich wird bis zur Rotglut erhitzt, bis keine Gasentwicklung mehr erfolgt.

Durch Einstellen des noch heißen Tiegels in kaltes Wasser wird eine rasche Abkühlung und gleichzeitig eine Loslösung des Schmelzkuchens bewirkt.

Man löst diesen in einem bedeckten Becherglase vorsichtig in verdünnter Salpetersäure auf, spült den Tiegel mit heißem Wasser aus und gibt letzteres zu der Hauptmasse. In der salpetersauren Lösung wird alsdann die Phosphorsäure nach dem Molybdänverfahren bestimmt.

Auf vorstehende Weise wurden folgende Werte erhalten:

Spermafett von	Angew. Menge g	Phosphorsäure %	Lecithin [1]) %	Stickstoffbestimmung: Angew. Menge g	Stickstoff gefunden %	Stickstoff berechnet %
Hering .	0,8175	1,83	**20,7**	0,3630	0,42	0,35
Karpfen .	0,5700	1,79	**20,2**	0,3160	0,23	0,33

Um den unverseifbaren Anteil der Fette zu bestimmen, wurden einige Gramm mit alkoholischer Kalilauge bis zur klaren Lösung verseift, die Seife mit Wasser verdünnt und nach dem Erkalten im Schütteltrichter mit Äther dreimal aus-

[1]) Als Dioleinlecithin $C_{44}H_{86}NPO_{9}$ berechnet.

geschüttelt. Die ätherische Lösung wurde alsdann abdestilliert, der Rückstand wieder mit etwas Kalilauge gekocht und nochmals mit Äther behandelt. Diese ätherischen Lösungen hinterließen nach dem Abdestillieren einen krystallinischen Rückstand, „das Unverseifbare“.

Nach Wägung wurde dieser Teil 6 mal aus Alkohol umkrystallisiert und durch Beobachtung der Krystallform sowie Bestimmung des Schmelzpunktes als Cholesterin charakterisiert.

Es ergaben sich die Werte:

Spermafett von	Angewendete Menge	Unverseifbares		Schmelzp. des Cholesterins
	g	g	%	
Hering	5,73	1,039	17,9	149,6° (korr.)
Karpfen	4,04	0,453	11,2	149,9° („)

Das Fischsperma enthält hiernach Fleischbasen (Xanthine, Kreatinin) und freie Aminosäuren sowie mit Nucleinstoffen verbundene Protamine. Das Fett aus Fischsperma besteht zum großen Teil aus Lecithin (20,2 bis 20,7 %) und Cholesterin (11,2 bis 17,9 %).

Der Fischrogen als Nahrungsmittel für den Menschen.

Von

J. König und J. Großfeld.

(Aus der Landwirtschaftlichen Versuchsstation in Münster i. W.)

(Eingegangen am 7. Juli 1913.)

Mit 1 Figur im Text und 2 Tafeln.

1. Allgemeine Zusammensetzung.

Die allgemeine Zusammensetzung des Fischrogens ist bereits mehrfach chemisch festgestellt worden.

So geben J. König und A. Splittgerber[1]) die allgemeine Zusammensetzung von Heringsrogen[2]) wie folgt an:

Zustand	Wasser %	Stickstoff %	Stickstoff-Substanz %	Fett %	Asche %
Lufttrocken . .	10,26	12,11	75,69	3,61	3,44
Wasserfrei . .	—	13,49	84,53	4,02	3,83

Enrico Rimini[3]) erhielt bei seinen Untersuchungen über einige See-Fischrogen folgende Werte:

Bestandteile	Meeräsche-Rogen[4]) %	Thunfisch-Rogen[4]) %	Kabeljau-Rogen %
Wasser	16,506	34,719	70,360
Fett	28,045	17,970	1,814
Extraktstoffe	9,227	5,779	2,363
Mineralstoffe	4,818	13,670	2,056

[1]) Die Bedeutung der Fischerei für die Fleischversorgung S. 77.

[2]) Von Heringen aus dem Nordostseekanal.

[3]) Staz. sperim. Ital. 36, 249 bis 278, 1903.

[4]) Zweifellos vorgetrocknet, wie aus dem niedrigen Wassergehalt hervorgeht.

Bestandteile	Meeräsche-Rogen %	Thunfisch-Rogen %	Kabeljau-Rogen %
Kochsalz	1,208	11,089	0,120
Gesamt-Stickstoff	7,278	5,162	4,008
Protein-Stickstoff	6,603	4,534	3,837
Protein-Stickstoff × 6,25 . .	41,269	28,340	23,983
Säure = Ölsäure	3,944	6,950	1,165

Nach P. Buttenberg[1]) hatte Störrogen folgende allgemeine Zusammensetzung:

Bestandteile		Frischer Störrogen mit Häuten a	Frischer Störrogen mit Häuten b
Wasser		62,82 %	61,84 %
Asche		1,74 %	1,69 %
Stickstoffsubstanz		23,19 %	22,37 %
Fett		9,24 %	10,61 %
Kochsalz		0	0
Phosphorsäure		—	0,663 %
Trockensubstanz	Fett	24,85 %	27,80 %
	Stickstoffsubstanz .	62,37 %	58,62 %
	Asche	4,68 %	4,48 %
	Phosphorsäure . .	—	1,737 %

Aussehen, Geruch, Geschmack: schwarzgrau; Körner etwa 2 mm, in Häuten eingeschlossen; Geruch eigentümlich; Geschmack fade, eigentümlich fischartig mit kratzendem Nachgeschmack.

Für eine Probe Dorschrogen fand E. Solberg[2]):

Wasser %	Stickstoff-substanz %	Verdaul. Protein %	Amid-substanz %	Fett %	Asche %
66,03	29,92	20,58	4,67	2,26	2,16

Auch der am meisten geschätzte Fischrogen, der Kaviar ist schon mehrfach auf seine allgemeine Zusammensetzung

[1]) 4. Bericht des hygien. Instituts Hamburg 1900 bis 1902, S. 13 bis 15.

[2]) Bericht der Norw. Landwirtschaftl. Versuchsstation Trondheim für 1906, Kristiania 1907, vgl. Zeitschr. f. Unters. von Nahrungs- u. Genußmitteln 16, 364, 1908.

untersucht. J. König und A. Splittgerber[1]) z. B. geben hierfür an:

In natürlichem Zustand:

Kaviar	Wasser %	Stickstoff-substanz %	Fett %	Stickstoff-freie Extraktstoffe %	Asche %	Chlor-natrium %
Körniger	47,86	29,34	13,98	1,30	7,42	6,18
Gepreßter	37,79	38,01	15,52	1,08	7,60	6,22

In der Trockensubstanz:

Kaviar	Stickstoffsubstanz %	Fett %	Stickstoff %
Körniger	56,38	26,86	9,02
Gepreßter	61,09	24,95	9,77

Enrico Rimini[2]) untersuchte verschiedene Kaviarsorten und erhielt folgende Werte:

Bestandteile	Roter Kaviar %	Italienischer Kaviar %	Deutscher Kaviar %	Russisch. Kaviar %	Russisch. gepreßter Kaviar %
Wasser	45,371	41,633	44,253	43,281	35,424
Fett	18,753	16,433	14,667	16,557	16,453
Extraktivstoffe . . .	4,739	3,785	3,789	4,134	5,278
Mineralstoffe	3,551	11,925	10,820	8,859	8,577
Chlornatrium . . .	1,337	9,529	8,716	6,706	6,110
Gesamt-Stickstoff . .	4,425	4,510	4,485	4,645	5,589
Protein-Stickstoff . .	4,315	4,297	4,260	4,352	5,518
„ „ × 6,25	26,966	26,450	26,628	27,197	34,490
Säure = Ölsäure . .	0,631	2,879	4,230	3,132	4,685

Durch seine Untersuchungen über Stör- und Dorschkaviar gelangte P. Buttenberg[3]) zu folgendem Ergebnis:

---

[1]) Die Bedeutung der Fischerei f. d. Fleischversorgung S. 77.

[2]) Staz. sperim. Ital. 36, 249 bis 278, 1903.

[3]) 4. Bericht des hygienischen Institutes Hamburg 1900/02, S. 13 bis 15. Vgl. Zeitschr. f. Untersuch. von Nahrungs- und Genußmitteln 7, 233, 1904.

Nr.	Sorte	Aussehen, Geruch, Geschmack	Wasser %	Asche %	Stickstoff-substanz %	Fett %	Kochsalz %	Phosphor-säure %
1	Kaviar, gesalzen	Grünlich, schwarzgrau, Körner etwa 2,5 mm Durchmesser, etwas geschrumpft, zäh, zusammenhängend, Geruch milde.	43,99	9,61	29,62	7,70	7,12	0,318
2	Kaviar, gesalzen	Grünlich, schwarzgrau, Körner etwa 2,5 mm Durchmesser, voll und rund, nur wenig geschrumpft, Geruch milde.	47,25	9,98	27,31	7,59	7,55	0,624
3	Frischer Elbkaviar, gesalzen	Grünlich, schwarzgrau, Körner 2,5 mm Durchmesser, voll und rund, Geruch milde.	50,27	10,09	23,19	11,39	8,05	0,631
4	Dorschkaviar	Breiartige, schwach orangerötliche Masse, Körner etwa 1/2 mm Durchmesser; Geschmack stark salzig, ähnlich wie Heringsrogen.	66,28	20,14	10,62	1,27	19,05	0,196
5	Dorschkaviar (verfälscht)	Schmierige, schwarzgraue Masse mit etwas heller erscheinenden Fischeiern 1/4 bis 1/2 mm Durchmesser, Geruch und Geschmack an Heringslake erinnernd.	66,34	7,60	18,57	5,49	4,14	1,22

In kochsalzfreier Trockensubstanz:

Nr.	Sorte	Fett %	Stickstoff-substanz %	Kochsalz-freie Asche %	Phosphor-säure %
1	Kaviar, gesalzen	15,75	60,58	5,09	0,650
2	Kaviar, gesalzen	16,79	60,42	5,37	1,380
3	Frischer Elbkaviar, gesalzen	27,33	55,63	4,89	1,514
4	Dorschkaviar	8,66	72,39	7,43	1,336
5	Dorschkaviar (verfälscht) .	18,59	62,90	11,72	4,130

Nr. 1, 2, 3 Geschmack pikant. Nr. 5 enthielt Borsäure, Nr. 2 Spuren Borsäure; in Nr. 1, 3, 4 war Borsäure nicht nachweisbar, ebenso in allen Proben keine Salicylsäure.

K. Farnstein, K. Lendrich, P. Buttenberg, A. Kickton und M. Klassert[1]) teilen über eine Probe Elbkaviar folgendes mit:

Aussehen grünlich-schwarz, etwas schmierige, etwa 2,5 mm

[1]) 5. Bericht der Nahrungsmittelkontrolle Hamburg 1903/04, S. 39. Vgl. Zeitschr. f. Unters. von Nahrungs- und Genußmitteln 1906, 742.

große Körner; Geruch milde; Geschmack pikant; Wasser 49,26 %, Asche 7,66 %, Stickstoff-Substanz 23,25 %, Fett 12,53 %, Chlornatrium 5,54 %, Phosphorsäure 1,07 %. Borsäure war nicht nachweisbar; in der kochsalzfreien Trockensubstanz: Fett 27,72 %, Stickstoff-Substanz 51,44 %, Asche 4,70 %, Phosphorsäure 2,73 %.

Diese Untersuchungen geben wenig Einblick in die eigenartigen Bestandteile des Fischrogens bzw. Kaviars. Um hierüber Aufklärung zu erhalten, haben wir folgendes Verfahren angewendet:

Eine nicht zu kleine Menge Rogen (10 bis 20 g) wird mit oder ohne Zusatz von Seesand so lange zerrieben, bis keine ganzen Eier mehr vorhanden sind, dann wird koliert, mit Wasser nachgewaschen, bis dieses klar abläuft, und die auf dem Koliertuch bleibenden Teilchen möglichst quantitativ auf ein schwedisches Filter gespült und nach Abtropfen der Flüssigkeit mitsamt dem Filter nach Kjeldahl verbrannt; der Stickstoff gibt, mit dem üblichen Faktor 6,25 multipliziert, die Menge der Eischalen.

Das Kolat wird mit vielem Wasser und zur Konservierung mit etwas Chloroform versetzt und so lange stehen gelassen, bis das Ichthulin sich klar abgesetzt hat; dann wird die über dem abgeschiedenen Ichthulin stehende Flüssigkeit wiederholt abgehebert, schließlich das Ichthulin abfiltriert, in Schwefelsäure gelöst und ebenfalls nach Kjeldahl verbrannt[1]).

Die abgeheberte ev. filtrierte Flüssigkeit scheidet beim Kochen das Albumin in Flocken ab. Nach dem Abfiltrieren und Auswaschen wird sein Stickstoff wie bei den anderen Proteinen bestimmt.

Das die Basen und Aminosäuren enthaltende Filtrat wird gleichfalls zur Kontrolle nach dem Eindampfen in konz. Schwefelsäure gelöst und nach Kjeldahl verbrannt.

---

[1]) Wegen der meist bedeutenden Menge empfiehlt es sich, das Ichthulin mit 50 bis 100 ccm zu lösen und von dieser Lösung einen aliquoten Teil zur vollständigen Verbrennung zu verwenden. Da die auf diese Weise gewonnenen Proteine Lecithin enthalten, wird dessen Stickstoff nach vorstehendem Verfahren gleichzeitig mit bestimmt. Bei genauen Untersuchungen empfiehlt es sich daher, die noch feuchten Proteine mit Alkohol und Äther bis zur Erschöpfung zu extrahieren und den Rückstand sowie Extrakt für sich zu verbrennen, wobei der Stickstoff des Rückstandes, mit 6,25 multipliziert, einen Wert für das betreffende Protein ergibt, während für den Auszug der Faktor 57,34 (für Diolein-Lecithin $C_{44}H_{86}NPO_9$ mit 1,744 % Stickstoff) angebracht ist. Der Stickstoffgehalt des Filtrates gibt keinen genauen Anhaltspunkt für die Menge der Extraktivstoffe; diese wird am einfachsten aus der Differenz: Stick-

Bei Herings- und Karpfenrogen behandelten wir anfangs den Teil, der beim Aufschlämmen mit Wasser zurückblieb, als „weiße Eier“ für sich. Später zeigte sich jedoch, daß dieselben neben Proteinstoffen auch noch Basen und Aminosäuren enthielten; außerdem erwies sich die quantitative Ausbeute an „weißen Eiern“ je nach der Dauer der Berührung mit Wasser als veränderlich. Aus diesen Gründen addierten wir die Bestandteile der getrockneten „weißen Eier“ zu den übrigen des Rogens. Das Albumin konnte nebst den Basen und Aminosäuren durch Ausziehen mit Wasser, das Ichthulin durch Ausziehen mit 0,25 %iger Kalilauge und Fällen mit Säure, wenigstens teilweise, gewonnen werden.

Allgemeine Zusammensetzung von Rogen und Kaviar.

I. In der natürlichen Substanz.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Verteilung des Stickstoffs[1])									
Art des Rogens	Wasser %	Stickstoff (n. Kjeldahl) %	Stickstoff-substanz (Differenz) %	Eischalen (N × 6,25) %	Albumin (N × 6,25) %	Ichthulin (N × 6,25) %	(Basen und Aminos.) Sonstige[2]) (Differenz) %	(N × 6,25) %	Fett[3]) (Ätherextrakt) %	Asche %	Bemerkung
Karpfenrogen	66,15	4,432	29,97	3,63	16,43[4])		9,91	27,70	2,48	1,40	Süßwasserfische
Hechtrogen	63,53	4,500	33,01	3,75	2,38	17,29	9,59	28,13	1,40	2,06	
Saiblingsrogen	63,85	4,450	30,81	1,76	0,15	24,33	4,57	27,81	3,71	1,63	
Heringsrogen	69,22	4,212	25,21	3,20	4,83	13,68	3,50	26,32	4,19	1,38	Seefische
Kabeljaurogen I	72,10	3,683	24,44	2,57	2,70	11,47	7,70	23,02	1,33	2,13	
Kabeljaurogen II	73,98	3,549	—	—	—	—	—	22,19	1,48	1,24	

stoffsubstanz — (Eischalen + Albumin + Ichthulin), berechnet. (Vgl. Anm. 2 unten). Auch kann sie direkt aus der Bestimmung des aschenfreien Abdampfrückstandes festgestellt werden.

[1]) Nach obigem Verfahren gefunden oder auch teils (Karpfen-, Saiblings-, Heringsrogen) aus den Ausbeuten bei der Aufarbeitung der Rogen berechnet.

[2]) Gesamt-N-Substanz berechnet aus 100 — (Wasser + Fett + Asche); Basen + Aminosäuren aus Gesamt-N-Substanz — (Eischalen + Albumin + Ichthulin). Der aus dem Stickstoffgehalt berechnete Wert (Spalte 9) fällt in den meisten Fällen zu niedrig aus, da außer den Proteinen stickstoffärmere Bestandteile (Lecithin, Aminosäuren usw.) in nicht unbeträchtlicher Menge und auch Kohlenhydrate, wenn auch in geringer Menge, vorhanden sind.

[3]) Lecithin wird, wie einige Versuche ergaben, aus den getrockneten Eiern durch Äther meist nur in Spuren gelöst (zumal bei den fettärmeren Rogen).

[4]) Siehe Anm. 1 folgende Seite.

Allgemeine Zusammensetzung von Rogen und Kaviar (Fortsetzung).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Verteilung des Stickstoffs									
Art des Rogens	Wasser $^0/_0$	Stickstoff (n. Kjeldahl) $^0/_0$	Stickstoff-substanz (Differenz) $^0/_0$	Eischalen (N×6,25) $^0/_0$	Albumin (N×6,25) $^0/_0$	Ichthulin (N×6,25) $^0/_0$	(Basen und Aminos.) Sonstige (Differenz) $^0/_0$	(N×6,25) $^0/_0$	Fett (Ätherextrakt) $^0/_0$	Asche $^0/_0$	Bemerkung
Dorschkaviar	59,39	3,526	26,36	2,26	0,85	5,94	15,31	22,04	4,44	9,81	Kaviar
Elbkaviar	55,53	3,741	22,90	2,20	3,32	13,87	3,51	23,39	15,36	6,21	
Astrachankaviar	46,06	4,177	29,51	3,09	3,37	15,55	7,50	26,11	16,12	8,31	
II. In der aschefreien Trockensubstanz.											
Karpfenrogen	—	13,65	92,37	11,19	50,64[1])		30,54	85,37	7,64	—	Süßwasserfische
Hechtrogen	—	13,08	95,93	10,90	6,92	50,25	27,87	82,75	4,07	—	
Saiblingsrogen	—	12,89	89,25	5,10	0,44	70,48	13,24	80,56	10,75	—	
Heringsrogen	—	14,33	85,75	10,88	16,43	46,53	11,91	89,52	14,25	—	Seefische
Kabeljaurogen I	—	14,29	94,84	9,97	10,48	44,51	29,88	89,33	5,16	—	
Kabeljaurogen II	—	14,32	—	—	—	—	—	89,50	6,00	—	
Dorschkaviar	—	11,45	85,59	7,34	2,76	19,29	49,71	71,56	14,42	—	Kaviar
Elbkaviar	—	9,79	59,95	5,78	8,69	36,31	9,18	61,23	40,21	—	
Astrachankaviar	—	9,15	64,67	6,77	7,39	34,08	16,44	57,22	35,33	—	

Eine Chlorbestimmung in den Aschen der Kaviarsorten ergab für Dorsch-Kaviar 8,36 $^0/_0$, für Elb-Kaviar 5,35 $^0/_0$, für Astrachan-Kaviar 6,31 $^0/_0$ Chlornatrium; der mittlere Kochsalzgehalt für Kaviar berechnet sich aus sämtlichen oben mitgeteilten Analysen zu 7,72 (1,34 bis 19,05) $^0/_0$. In den von uns untersuchten Kaviarsorten waren ferner die Konservierungsmittel Borsäure und Salicylsäure nicht vorhanden[2]).

Wie ein Blick auf obige Tabellen zeigt, sind Wasser-,

[1]) Durch versuchsweise Behandlung mit Kochsalz war ein Teil des Ichthulins gelöst worden, so daß Albumin und Ichthulin nicht mehr getrennt bestimmt werden konnten.

[2]) Eine andere Probe, in einem hiesigen Geschäft gekauften Malossol-Kaviars enthielt (deklariert) als Konservierungsmittel „Urotropin"; dieses ist wie „Formin", „Aminoform" usw. eine andere Bezeichnung für Hexamethylentetramin und spaltet durch Säuren allmählich Formaldehyd ab. Sein Zusatz ist deswegen nicht unbedenklich.

Stickstoff- und Aschengehalt im allgemeinen weniger großen Schwankungen unterworfen, abgesehen davon, daß die Kaviarsorten wegen des Kochsalzzusatzes naturgemäß weniger Wasser und mehr Asche enthalten als die natürlichen Rogen.

Sehr verschieden ist der Fettgehalt der einzelnen Fischrogen, wie ja auch der Fettgehalt des Fischfleisches je nach der Art wechselt. Man kann sagen, daß fettreiche Fische auch fetten Rogen enthalten, und umgekehrt[1]). Der Fettgehalt läßt sich auch zum Wassergehalt, wie beim Fischfleische, in Beziehung bringen, wie auch Lichtenfelt[2]) sagt: „Es ist sicher, daß der verminderte Wassergehalt durch Fett ausgeglichen wird oder auf erhöhtem Fettgehalt beruht."

Die Verteilung der einzelnen Stickstoffverbindungen im Rogen ist gleichfalls nach der Fischart verschieden; doch überwiegt in den meisten Fällen das Ichthulin.

2. Zerlegung der einzelnen Bestandteile.

Für die Zerlegung der einzelnen Gruppenbestandteile mußten größere Mengen Rogen aufgearbeitet werden, was teilweise mit nicht unerheblichen Schwierigkeiten verbunden war.

Wir verfuhren dabei im allgemeinen wie vorstehend, S. 356 schon beschrieben ist. Abweichend waren davon nur folgende Behandlungen:

Zur Gewinnung und Bestimmung der Eihäute wurden die gewogenen Ovarien durch ein Sieb getrieben, dessen Maschendurchmesser den der Eier etwas übertraf, wobei die Häute zurückblieben.

Das Ichthulin schieden wir anfangs durch Zugabe von

---

[1]) Nach J. Lewkowitsch (Chem. Technologie und Analyse der Öle, Fette und Wachse 2, 226, 1905) ist bezüglich des Fettgehaltes der Fischleber das Umgekehrte der Fall, indem gerade fettarme Fische (z. B. Dorsch) den meisten Lebertran liefern. (Vgl. J. König u. A. Splittgerber, l. c. S. 113.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. des Menschen und der Tiere, Bonn 103, 353 bis 402, 1904.

Essigsäure oder durch Aussalzen mit Kochsalz ab, später erwies sich eine alleinige Zugabe von viel Wasser, wodurch das Ichthulin vollständig ausfiel und sich gut absetzte, als das einfachste Verfahren.

Zur Reinigung der Eiweißstoffe diente wiederholtes Aufwirbeln mit Wasser, Absitzenlassen und Abhebern, bis nichts mehr ausgezogen wurde (Chlorreaktion, Biuretreaktion).

Auch mit Hilfe der Dialyse ließen sich Albumin und Ichthulin zumal von den Salzen befreien; hierbei erwies sich ein Dialysator, wie er in nachfolgender Zeichnung im Querschnitt dargestellt ist, als recht brauchbar (Fig. 2).

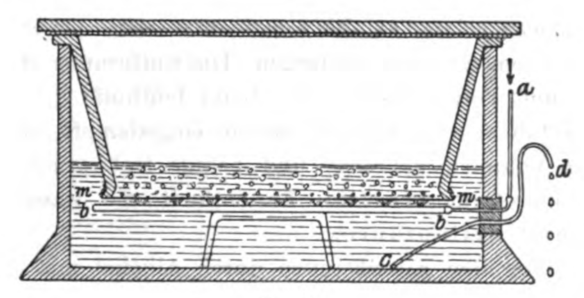


Fig. 2.

Der bei *a* eintretende, mittels Quetschhahn geregelte Wasserstrom wird in ein flachspiralig aufgerolltes Kupferrohr (*b*—*b*) geleitet, das an der Oberfläche zahlreiche feine Öffnungen besitzt, die das frische Wasser gegen die Membran (*m*—*m*) austreten lassen, während das Salzwasser zu Boden sinkt und durch *c*—*d* beständig entfernt wird. Dabei befindet sich das Flüssigkeitsniveau innerhalb des Dialysators und die Ausflußöffnung *d* in einer Höhe.

Das Dialysieren wurde stets so lange (mehrere Tage) fortgesetzt, bis das ausfließende Wasser mit Silbernitrat keine merkliche Reaktion mehr gab.

Die auf vorstehende Weise gewonnenen Roh-Ichthuline wurden hierauf soweit wie möglich abgesaugt oder durch Eindampfen bei mäßiger Hitze eingeengt, dann noch feucht zur Entfernung des Wassers und der fettartigen Bestandteile (Lecithin usw.) mit Alkohol ausgezogen. Am bequemsten geschah das in der Weise, daß die breiartige Eiweißmasse in eine sehr

dichte oben offene Filtrierpapierhülse gebracht und im Soxhlet-Apparat so lange mit öfters erneuertem[1]) Alkohol ausgezogen wurde, bis der Patroneninhalt sich ohne Mühe im Mörser pulvern ließ. Hierauf wurde das Protein zunächst noch einige Zeit mit Alkohol und schließlich mit Äther vom letzten Fett befreit. Nach dem Abdunsten des Äthers bildeten die so erhaltenen Ichthuline meist ein grauweißes oder gelblichweißes Pulver[2]).

Die durch Abhebern oder Abfiltrieren von dem Ichthulin gewonnene Flüssigkeit schied beim Einengen auf dem Wasserbade Albumin ab. Durch Abfiltrieren und Auswaschen oder, wie sich später zeigte, besser durch wiederholtes Absitzenlassen und Abhebern gelang es, die sonstigen wasserlöslichen Extraktstoffe aus demselben zu entfernen. Die Entfernung des letzten Wassers und Fettes geschah wie beim Ichthulin.

Das Filtrat vom Albumin wurde eingedampft, auf ein bestimmtes Volumen gebracht und behufs Haltbarmachung mit etwas Chloroform versetzt. Es enthielt die wasserlöslichen Basen und Aminosäuren.

Die aus den Eiweißstoffen durch Alkohol und Äther gelösten Fette blieben nach dem Abdestillieren der Lösungsmittel zurück. In einigen Fällen erschwerte ein ziemlich starkes Schäumen die Destillation. Doch ließ sich dieses durch öftere Zugabe von etwas Äther beseitigen. Die abgeschiedenen Fette wurden alsdann in Äther gelöst und wie bei Sperma, S. 347 ff. weiter behandelt[3]).

Bezüglich der Ausbeuten an den einzelnen Bestandteilen des Fischrogens sei auf die oben S. 356 mitgeteilte Tabelle verwiesen.

Über die Beschaffenheit und verarbeiteten Mengen der einzelnen Rogen möge folgende Tabelle Auskunft geben:

---

[1]) Da sonst leicht Schäumen oder Stoßen eintrat.

[2]) Das Ichthulin aus Saiblingsrogen war schneeweiß.

[3]) Auch beim Trocknen der Fette im Kohlendioxydstrom schäumte beim Durchleiten des Gases die Masse anfangs häufig auf. Dies ließ sich in der Weise verhindern, daß wir das Einleitungsrohr nicht eher in das Fett eintauchen ließen, bis der meiste Alkohol (der das Schäumen verursachte) abdestilliert war. Das alkoholfreie Fett war auch, wenn es noch viel Wasser enthielt, bei Wasserbadtemperatur leicht flüssig.

Rogen von	Äußere Beschaffenheit	Größe der Eier	Verarbeitete Menge (gesamt, einschl. der allgemeinen Untersuchung)	Darin Sehnen und Häute		Von Häuten befreiter Rogen für die Hauptuntersuchung	Sonstige Bemerkungen
		mm	g	g	%	g	
Hering[1])	Fest, körnig, rötlichgelb	1–2	2373	58	2,4	2103	Von 132 Stück laichreifen Heringen.
Karpfen[1])	Schwach grünlich, weniger fest als Heringsrogen	ca. 2	1361	50	3,7	1106	Von einem Karpfen.
Saibling	Schön goldgelb, beim Berühren leicht knirschend . . .	4	1935	—	—	1535	Äußerst widerstandsfähige Schalen.
Kabeljau I[2])	Ziemlich fest, gelbrötlich	1	3529	193	5,5	3016	Die Häute waren schwach angefault.
Kabeljau II	Desgleichen	1	939	31,5	3,4	—	Frisch.
Hecht	Bräunlich-gelb, dünnbreiig	2	575	29	4,1	104	—
Dorschkaviar	Gelbweiß-hellgrau, trotz seines hohen Wassergehaltes fest	1	560	—	—	460	Eigenartiger Geruch[3]), Geschmack fast wie Störkaviar.
Elbkaviar	Dünnbreiig, dunkelbraun, grünschwarz	kaum 2	624	—	—	510	Das getrocknete Ichthulin besaß eine graue Farbe.
Astrachankaviar	Färbung etwas dunkler als voriger und körniger	2,5	455	—	—	355	(wie oben)

3. Trennung und Bestimmung der Fleischbasen und Aminosäuren.

K. Linnert[4]) kochte 50 g körnigen und 80 g gepreßten Kaviar mit der 10fachen Menge 0,5%iger Schwefelsäure wäh-

[1]) Der Rogen von Hering und Karpfen wurde etwas anders verarbeitet als der Rogen der anderen Fische, nämlich: 2103 g von Häuten befreiter Rogen lieferten 1481 g sog. „weiße Eier" von der Zusammensetzung: Wasser 75,83%, Asche 0,61%, Stickstoffsubstanz (N×6,25) 21,32%, Fett 3,04%. 1106 g Karpfenrogen ergaben 70,9 g weiße Eier von der Zusammensetzung: Wasser 5,73%, Asche 1,43%, Stickstoffsubstanz 88,06%, Fett 2,21% (lufttrocken). Beim Ausfällen des Karpfen-Ichthulins mit Essigsäure trat eine rötliche Färbung auf.

[2]) Die Ovarien wurden durch eine Fleischmühle mit 4-mm-Sieb zerkleinert und durch ein 1-mm-Sieb getrieben, wobei die zum Teil zerkleinerten Häute zurückblieben; der Rest hatte sich um die Walze der Fleischmühle gelegt und ließ sich von dort leicht entfernen.

[3]) Jedenfalls von Gewürzen herrührend, etwa an Leberwurst erinnernd.

[4]) Diese Zeitschr. 18, 209, 1909.

rend 12 Stunden; nach Entfernung der Schwefelsäure mit Bariumcarbonat versetzte er das Filtrat nach dem Eindunsten mit einem Gemisch von gleichen Teilen 33%iger Natronlauge und halbgesättigter Sodalösung, filtrierte, säuerte mit Salzsäure an, machte ammoniakaliseh und fügte ammoniakalische Silberlösung zu, wobei er keinen Niederschlag feststellen konnte. Hieraus schließt Linnert, daß im Kaviar keine Xanthinbasen vorhanden seien.

Da, abgesehen von dem Nachweis der Fleischbasen im Fischfleisch durch J. König und A. Splittgerber[1]), sowie im Fischsperma u. a. durch eigene Untersuchungen[2]), auch E. Salkowski[3]) im Hühnerei mittels der Kreatininreaktionen von Weyl, und in Gemeinschaft mit Jaffé ferner durch Abscheidung mit Chlorzink unzweifelhaft Kreatinin nachgewiesen hat, so kann der vorhin erwähnte Befund K. Linnerts auffallend erscheinen.

Wir haben daher diese Frage weiter geprüft und dabei folgendes Verfahren eingeschlagen:

In den vom Albumin befreiten Kaltwasserauszügen der Fischeier bestimmten wir zunächst Stickstoff, Trockensubstanz[4]) und Asche, wobei sich folgende Werte ergaben:

Es enthielten im Kaltwasserauszug auf je 1000 g Rogen berechnet:

Substanz	Stickstoff g	Trockensubstanz g	Asche g	Organische Substanz g	Darin Stickstoff %
(Heringsrogen[5]) . .	5,08	41,21	6,21	35,0	14,5
(Karpfenrogen[5]) .	14,77	—	—	99,1	14,9
Saiblingsrogen . .	1,77	21,60	5,93	15,7	11,3
Kabeljaurogen . .	4,67	45,10	9,90	35,2	13,3
Dorschkaviar . . .	15,74	238,30	100,90	137,4	11,4
Elbkaviar	4,45	99,50	59,50	40,0	11,2
Astrachankaviar .	4,76	124,10	83,10	41,0	13,0

[1]) Die Bedeutung der Fischerei usw. S. 116ff.

[2]) Vgl. Abhandlung über Sperma.

[3]) Diese Zeitschr. 32, 335, 1910.

[4]) Die Bestimmung der Trockensubstanz erwies sich bei Hering und Karpfen insofern schwierig, als die organische Substanz sich in der Hitze etwas zersetzte; bei Karpfen war außerdem wegen der vorhandenen großen Salzmengen die Aschenbestimmung erschwert.

[5]) Die Gewinnung des Extraktes war, da ein Teil in den „weißen

Von diesen Lösungen (außer bei den Auszügen von Saiblings- und Kabeljaurogen) wurde alsdann ein aliquoter Teil mit phosphorwolframsaurem Natrium und Schwefelsäure nach Baur und Barschall[1]), wie bei Sperma, gefällt. Die weitere Behandlung geschah bei Herings- und Karpfenrogen ebenfalls genau wie beim Fischsperma.

Bei den Auszügen aus den übrigen Rogen fällten wir jedoch die Xanthinbasen nicht mehr mit Natriumbisulfit und Kupfersulfat, sondern mit einer selbstbereiteten alkalifreien Kupferbisulfitlösung[2]). Durch Schwefelwasserstoff und Bariumcarbonat läßt sich dieses Fällungsmittel quantitativ wieder entfernen, ohne daß bei der Abscheidung des Kreatinins und der übrigen Basen sehr lästige Alkalisalze in Lösung gelangen.

Aus den Kaltwasserauszügen der zuletzt untersuchten Rogen (Saibling, Kabeljau, Hecht) schieden wir die Purinbasen direkt mit Kupferbisulfit aus[3]) und trennten aus gleichen Gründen wie vorhin die übrigen Basen und Aminosäuren durch eine 10%ige wässerige Lösung von reiner Phosphorwolframsäure, da es uns bei diesen beiden Rogen weniger auf eine Übersicht über die klassenmäßige Stickstoffverteilung als auf die Isolierung einzelner Basen und Aminosäuren, in Anbetracht der großen zur Verwendung gekommenen Rogenmengen, ankam.

Eine Übersicht über die prozentuale Stickstoffverteilung in den wässerigen Auszügen von „weißen Eiern“ aus Herings- und Karpfenrogen sowie von den Kaviarsorten gibt folgende Tabelle, die auf quantitativen Bestimmungen beruht:

Eiern“ blieb, nicht quantitativ: beim Karpfenextrakt verhinderten auch die großen Salzmengen eine quantitative Gewinnung. Deswegen wurde der Wert für Spalte 4 aus der Tabelle für allgemeine Zusammensetzung (S. 356 u. 357) entnommen, die übrigen hierauf umgerechnet.

[1]) Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte 24, 552, 1906.

[2]) 20 g Kupferhydroxyd wurden mit etwa der 20fachen Menge Wasser übergossen; dann wurde Schwefeldioxyd bis zur Sättigung eingeleitet und vom Ungelösten abfiltriert. Das grünblaue Filtrat enthielt das Kupferbisulfit. Beim Aufbewahren der Lösung schied sich aber allmählich Kupfersulfit wieder aus.

[3]) Der Auszug aus Saiblingsrogen wurde zuerst mit verdünnter Schwefelsäure nach Micko gekocht, um die Xanthinbasen aus möglicherweise vorhandenen Verbindungen abzuspalten. Aus Kabeljaurogen schieden wir, ohne vorher mit Säure zu kochen, also nur die im freien Zustand vorhandenen Basen ab.

Wässeriger Auszug von	1. Basen-Stickstoff %	2. Davon Ammoniak-Stickstoff %	3. Aminosäuren-Stickstoff %	4. Stickstoff in nicht bestimmter Form %
Heringsrogen (weiße Eier)	19,8	Nicht bestimmt	44,3[1]	35,9
Karpfenrogen (weiße Eier)	39,8		36,1[1]	24,1
Dorschkaviar	24,1	17,5	68,3	7,6
Elbkaviar	25,7	13,6	55,4	18,9
Astrachankaviar	25,2	11,5	32,7	42,2

Diese Zahlen zeigen, daß einmal bei der Entfernung der Schwefelsäure durch Bariumcarbonat wechselnde, aber nicht unbedeutende Mengen Stickstoffsubstanz (Spalte 4) unlöslich abgeschieden werden, die den Barytmassen durch wiederholtes Auskochen nicht entzogen werden können. Die Menge der Aminosäuren (Spalte 3) ist (besonders bei Elb- und Dorschkaviar) sehr bedeutend. Bis über die Hälfte des Basenstickstoffs (Spalte 1) des Kaviarextraktes besteht aus Ammoniak (Sp. 2). Vielleicht läßt sich aus der Menge der einzelnen Stickstoffverbindungen ein Schluß auf Güte und Alter eines Kaviars ziehen, nämlich in der Weise, daß hoher Aminosäuren- und Ammoniakgehalt, sowie niederer Gehalt an nicht bestimmbaren basischen Stoffen (Sp. 4) auf eine minderwertigere Ware deutet. Doch würden zur sicheren Entscheidung dieser Frage eine größere Anzahl von Analysen notwendig sein.

Zur Isolierung der einzelnen Stickstoffverbindungen wurden die in oben beschriebener Weise als Silberverbindungen abgeschiedenen Xanthinbasen mit Schwefelwasserstoff vom Silber befreit und durch Stickstoffbestimmung als solche identifiziert. Hierbei erhielten wir bei Herings- und Karpfenrogen folgende Zahlen:

Bestandteile	Wasserauszug von Rogen aus	
	Hering g	Karpfen g
Org. Trockensubstanz	13,82	6,90
Xanthinsilber	0,1200	0,1080
Xanthinbasen in Proz. der org. Trockensubstanz	0,38	0,68
Stickstoff in Xanthinsilber: gefunden . . .	0,0174	0,0205
" " " : berechnet . . .	0,0175	0,0157

[1]) Der ursprüngliche Auszug enthielt 25,8% (Hering) bzw. 22,8% (Karpfen) durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stickstoff.

In den Auszügen aus den Kaviarsorten und den „weißen Eiern“ von Hering und Karpfen wurden die Xanthinbasen durch gleichzeitige Stickstoff- und Silberbestimmungen nachgewiesen:

Auszug von	Organische Trockensubstanz	Davon Xanthinbasen [1]		Darin Stickstoff		Silber [2]	
						gefunden	berechnet
	g	g	%	mg	%	mg	mg
Hering „weiße Eier“	—	0,0540	—	18,90	35,0	56,9	58,2
Karpfen desgl. . .	—	0,0325	—	10,96	33,7	31,3	33,9
Dorschkaviar . .	18,96	0,0085	0,05	4,54	53,4	12,0	14,0
Elbkaviar	12,25	0,0280	0,23	7,94	28,4	23,0	24,5
Astrachankaviar .	8,73	0,0355	0,40	10,96	30,8	33,5	33,9

Aus 66,8 g Hechtrogen wurden 0,0220 Xanthinsilber gewonnen. 0,0193 g von diesem enthielten 0,0119 g Ag (ber. 0,0109 g).

Sehr geringe Mengen Xanthinbasen schieden sich aus dem wässerigen Auszuge von Saiblingsrogen (1228 g) ab. Der mit ammoniakalischer Silberlösung entstehende Niederschlag war anfangs fast unsichtbar und konnte wegen seiner geringen Menge nicht weiter untersucht werden[3].

Im Gegensatz hierzu enthielt der Kabeljaurogen bedeutende Mengen Purinstoffe. Die mit ammoniakalischer Silberlösung in dem aufgelösten und entkupferten Kupferbisulfitniederschlag entstehende Fällung enthielt, 2865 g Rogen entsprechend, 3,154 g freie Xanthinbasen und 4,6684 g Silber[4]. 0,1755 g der Basen enthielten nach Kjeldahl verbrannt 60,12 mg Stickstoff oder 34,2 %.

Eine weitere Trennung dieser Purinstoffe gelang nach dem von Krüger und Salomon[5]) angegebenen Verfahren auf folgende Weise:

[1]) Lufttrocken gewogen.

[2]) Auf Adenin berechnet.

[3]) Vgl. den verhältnismäßig hohen Xanthingehalt des Saiblings-Ichthulins S. 388 (Tabelle).

[4]) Dieser zu hohe Silberwert zeigt an, daß ein Teil der schwerlöslichen Basen in dem abgeschiedenen Schwefelsilber zurückblieb und nicht mitbestimmt wurde. Der Gehalt an Xanthinbasen ist also wahrscheinlich noch etwas höher als gefunden ist, nämlich aus dem Ag-Wert berechnet: 3,289 g Xanthin. Doch können auch sonstige Silberverbindungen (Phosphate usw.) mit ausfallen und den Wert für Silber erhöhen.

[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 373, 1898.

Die Basen wurden mit heißer Salzsäure angerührt und dann auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft, hierauf mit Wasser versetzt, nochmals zur Trockne verdampft und das gleiche mit Alkohol wiederholt. Nunmehr wurde der grobpulverige Rückstand mit Wasser von ca. 40° digeriert und einige Zeit stehen gelassen, dann abfiltriert und bis zum Verschwinden der Chlorreaktion ausgewaschen. Der gelbbraun gefärbte Rückstand, die „Xanthinfraktion", erwies sich als leichtlöslich in Alkalien und Ammoniak, fast unlöslich in Essigsäure. Eine kleine Probe, mit Salpetersäure abgeraucht, lieferte einen citronengelben Rückstand, der sich beim Betupfen mit Natronlauge schön rotviolett färbte. Um das Nitrat der Base herzustellen, wurde ein kleiner Teil in verdünnter Natronlauge gelöst, auf ca. 60° erwärmt und in Salpetersäure vorsichtig eingegossen. Nach mehrtägigem Stehen schieden sich auch etwa 2 mm große derbe gelbgefärbte Drusen, aus kleinen Blättchen bestehend, ab (vgl. Fig. 3, Tafel I), die für Xanthinnitrat charakteristisch sind. Aus der Mutterlauge krystallisierten nach einigen Tagen noch weitere Mengen Xanthinnitrat aus. Da sich die Xanthinfraktion in verdünntem Ammoniak klar löste und auch das Filtrat von derselben hiermit keinen nennenswerten Niederschlag gab, konnte die Abwesenheit von größeren Mengen Guanin als sichergestellt gelten.

Hierauf wurde das Filtrat von Xanthin neutralisiert und mit Natriumpikrat versetzt; hierbei trat gleichfalls nur eine sehr geringe Trübung ein, so daß Adenin auch nur in Spuren vorhanden sein konnte.

Nach dem Abfiltrieren wurde die Pikrinsäure durch Ansäuern mit Schwefelsäure und Ausschütteln mit Benzol aus dem Filtrate entfernt, dann Ammoniak im Überschuß und Silberlösung zugegeben, der Niederschlag gut ausgewaschen und mit Salzsäure zerlegt. Nach Neutralisation und Versetzen mit Natriumpikrat in der Wärme schieden sich beim Erkalten derbe Krystalle (Prismen) von gelber Farbe ab. Eine geringe Menge derselben, in Wasser gelöst, lieferte auch nach sehr großer Verdünnung mit Silbernitrat einen citronengelben, körnigen Niederschlag. Eine weitere Menge des Filtrates wurde in der Wärme mit Salpetersäure zerlegt, die Pikrinsäure mit Benzol entfernt, das Filtrat auf ein kleines Volumen eingeengt und zur Kry-

stallisation hingestellt; hierbei schieden sich bereits nach kurzer Zeit wetzsteinförmige Krystalle ab (vgl. Fig. 4, Tafel I). Eine Lösung dieser Krystalle, heiß mit Silbernitrat versetzt, bildete in der Kälte Drusen, aus langen mikroskopischen Prismen bestehend (vgl. Fig. 5, Tafel I). Somit kann auch die Anwesenheit von Hypoxanthin (Sarkin) gleichfalls als bewiesen gelten.

Hiernach bestehen also die Purinbasen des Kabeljaueies vorwiegend aus den beiden Oxypurinen Xanthin und Hypoxanthin. Da diese außer durch salpetrige Säure auch durch Fäulnis und Enzymwirkung aus den betreffenden Aminopurinen Guanin und Adenin sekundär gebildet werden können[1]), ist es nicht ausgeschlossen, daß in frischen Fischeiern Guanin und Adenin vorhanden sind[2]).

Jedenfalls kann es nach vorstehenden Untersuchungen keinem Zweifel unterliegen, daß, entgegen der Ansicht K. Linnerts, Purinbasen in Kaviar und Fischrogen überhaupt vorhanden sind, mögen sie auch an Menge oft so gering sein, daß ihr Nachweis bei Anwendung einer kleinen Substanzmenge nur schwierig gelingt.

Der sichere Nachweis des Kreatinins aus der von Xanthin befreiten Phosphorwolframsäure-Fällung gelang am besten auf folgende Weise:

Die Lösung wurde auf ein kleines Volumen (5 bis 10 ccm) bis zur sirupartigen Konsistenz auf dem Wasserbade eingedampft, erkalten gelassen und mit der etwa 10fachen Menge Spiritus (95 $^0/_0$) versetzt. Hierbei schied sich ein amorpher, schleimiger Stoff ab, der sich teils an den Gefäßwänden festsetzte, teils durch Absaugen besonders nach Zusatz von etwas Kieselgur leicht entfernt werden konnte. Nach Lösung der Fällung in heißem Wasser und Versetzen mit Pikrinsäure und Natronlauge zeigte sich, daß er nur sehr wenig Kreatinin mehr enthielt, während die Hauptmenge in den alkoholischen Auszug übergegangen war. Durch ein- und zweimalige Wiederholung des Verfahrens ging alles Kreatinin in den alkoholischen Auszug über. Der Alkohol wurde alsdann abdestilliert und die Lösung schließlich auf dem Wasserbade fast zur Trockne ein-

---

[1]) Vgl. A. Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **10**, 258, 1886. — S. Schindler, Zeitschr. f. physiol. Chem. **13**, 441, 1889.

[2]) Vgl. auch H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 406, 1906.

geengt, der Rückstand in etwa 100 ccm heißem Wasser aufgenommen, wobei sich meistens eine weitere Menge jenes Fremdkörpers abschied, von dem filtriert wurde. Die nunmehr erhaltene Kreatininlösung wurde auf etwa 10 ccm gebracht, mit möglichst wenig Essigsäure sehr schwach angesäuert und zu der Lösung eine eben genügende Menge gesättigter, alkoholischer Chlorzink-Lösung (meist 0,5 bis 1 ccm) von neutraler Reaktion zugefügt[1]).

Auf diese Weise konnte das Kreatinin als Chlorzink-Doppelsalz in Form einzelner Nädelchen, die bei Karpfenrogen teilweise zu Nadelbüscheln vereinigt waren, erhalten werden (vgl. Fig. 6, Tafel I). Bezüglich der Kreatinin-Chlorzink-Krystallisationen aus den „weißen Eiern" von Hering und Karpfen sowie den Kaviarsorten wurde folgendes beobachtet:

Verhalten	„Weiße Eier" aus Hering	„Weiße Eier" aus Karpfen	Dorschkaviar	Elbkaviar	Störkaviar
Krystallform des Kreatinin-Chlorzink	Keulenförmige Krystalle, teilweise zu Drusen vereinigt	Wenige Drusen aus einzelnen dicken Nadeln	Einzelne vierseitige Prismen, teils am Ende zugespitzt[2])	Drusen und Nadeln in ziemlicher Menge	Einzelkrystalle in Keulenform
Reaktion mit mit Pikrinsäure und Natronlauge	deutlich	schwach	deutlich	sehr deutlich	deutlich

Das Kreatinin-Chlorzinksalz aus Saiblingsrogen krystallisierte in sehr schönen Büscheln (vgl. Fig. 7, Tafel I), während das aus Kabeljaurogen nur einzelne runde Gebilde erkennen

---

[1]) Kreatinin-Chlorzink ist löslich in Mineralsäuren, seine Löslichkeit in Wasser beträgt kalt 1 : 53, heiß 1 : 24; in Spiritus (87 %) 1 : 5743, in 98%igem Alkohol 1 : 9217 bei 15 bis 20°. K. Mioko (Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 5, 193, 1902) fällt das Kreatinin durch Chlorzink unter Vermeidung eines Überschusses aus mit Kalilauge schwach alkalisch gemachter alkoholischer Lösung. Hierbei geht jedoch einmal ein geringer, aber deutlich nachweisbarer Teil des Kreatinins in den zuerst entstehenden Zinkhydroxyd-Niederschlag, während andererseits die Kreatinin-Chlorzink-Krystalle mit Chlorkalium verunreinigt werden.

[2]) Von freiem Kreatin herrührend, da wahrscheinlich zu wenig Chlorzink zugesetzt war.

ließ[1]). Dafür gab dieses aber intensive Rotfärbung mit Pikrinsäure und Natronlauge [Jaffé[2])]. Gleichfalls trat mit Nitroprussidnatrium und tropfenweise zugefügter Natronlauge Rotfärbung ein, die allmählich in Gelb überging [Weyl[3])]. Eine Probe wurde ferner vom Zink befreit, mit Sodalösung gesättigt und mit Fehlingscher Lösung versetzt, wobei beim Erwärmen bald Trübung und Ausscheidung eines weißen flockigen Niederschlages von Cupro-Kreatinin eintrat [Maschke[4])].

In dem wässerigen Auszuge von 66,8 g Hechtrogen trat auf Zusatz von Pikrinsäure und Natronlauge deutliche Rotfärbung auf.

Noch auf andere Weise konnte im wässerigen Auszug von den „weißen Eiern“ aus Hering Kreatinin nachgewiesen werden.

Ein Teil des Filtrates vom Xanthinkupfer wurde mit Silbernitrat und Barytwasser ausgefällt, der Silberniederschlag mit Schwefelwasserstoff vom Silber und mit Schwefelsäure vom Baryt genau befreit; sodann wurde mit Salzsäure eingedampft und der Rückstand aus etwas Wasser umkrystallisiert. Unter den Krystallen waren die für Kreatinin-Chlorhydrat charakteristischen[5]) durchsichtigen Prismen neben rhombischen Tafeln, die wahrscheinlich dem durch Silber gefällten Kreatinin beigemengten sonstigen Basen angehörten (vgl. Fig. 8, Tafel II), vorhanden. Die erhaltene Menge war indes so gering, daß eine genauere Untersuchung nicht möglich war.

Wie die Formoltitration in den wässerigen Auszügen einiger Rogen ergab, bestand der nicht durch Phosphorwolframsäure fällbare Stickstoff im wesentlichen aus Aminosäuren-Stickstoff:

---

[1]) Nach längerer Zeit bildeten sich auch hier deutliche Krystalle.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, 133, 1880. Empfindlichkeit etwa 1 : 5000.

[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 11, 2175, 1878. Empfindlichkeit etwa 1 : 2000.

[4]) Zeitschr. f. anal. Chem. 17, 134, 1878. Empfindlichkeit etwa 1 : 10 000.

[5]) Vgl. Hoppe-Seylers Handb. d. chem. Analyse. Bearbeitet von H. Thierfelder, Berlin 1903, S. 130.

Auszug von	In der basenhaltigen Lösung		In der basenfreien Lösung	
	Gesamt-Stickstoff nach Kjeldahl g	als Formol-Stickstoff gefunden g	nicht gefällter Stickstoff nach Kjeldahl g	als Formol-Stickstoff gefunden g
Heringsrogen . . .	2,01	nicht bestimmt	0,56	0,46
Karpfenrogen . .	1,02	do.	0,23	0,25
„Weiße Eier“ von Hering	0,94	do.	0,42	0,43
„Weiße Eier“ von Karpfen	0,21	do.	0,08	0,09
Dorschkaviar . . .	2,17	1,26	1,48	0,80
Elbkaviar	1,34	0,88	0,75	0,74
Störkaviar	1,13	0,44	0,37	0,39

Wir haben aber auch versucht, einzelne Aminosäuren dadurch zu gewinnen, daß wir den mit phosphorwolframsaurem Natrium und Schwefelsäure ausgefällten Auszug aus Heringseiern, nach Entfernung der Fällungmittel durch Baryt, nach Neuberg und Kerb[1]) mit Mercuriacetat und Natriumcarbonat in alkoholischer Lösung fällten und den ausgewaschenen Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegten. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber lieferte nach dem Einengen Gebilde vom Aussehen der Leucinknollen neben einzelnen Nadeln.

Der wässerige Auszug der „weißen Eier“ von Hering wurde nach Entfornung der Basen stark eingedampft und mehrmals mit Alkohol ausgekocht, um die anorganischen Bestandteile abzuscheiden. Die alkoholischen Lösungen wurden dann eingeengt und zur Krystallisation hingestellt. Es schied sich nach einiger Zeit eine in Wasser sehr schwer lösliche Substanz ab, die nach dem Umkrystallisieren aus Wasser das Aussehen von kurzen, dicken, teilweise sternförmig gruppierten Nädelchen besaß. Mit Diazobenzolsulfosäure trat bei einem Teil derselben in sodaalkalischer Lösung intensive Rotfärbung ein. Hiernach lag also das in obigen Formen krystallisierende l-Tyrosin vor, das bei der Aufspaltung der Proteine mit Säuren sich nicht bildet und somit wohl vorgebildet in den Eiern vorhanden sein muß.

[1]) Neuberg und Kerb, diese Zeitschr. 40, 498, 1912.

Das sehr stickstoffreiche Aminosäurenfiltrat von Dorschkaviar wurde, um Cystin abzuscheiden, mit Aceton und Essigsäure versetzt, worauf sich nach einigen Tagen ein Konglomerat von Krystallen abschied, die zwar auf Kohle geschmolzen, die Heparreaktion gaben, aber nicht die übrigen Cystinreaktionen teilten. Die Substanz war ziemlich leicht in Wasser, schwer in verdünntem Alkohol, nicht löslich in Aceton. Aus Wasser umkrystallisiert, zeigten sich unter dem Mikroskop schön ausgebildete sechsseitige Prismen mit aufgesetzten Pyramiden (vgl. Fig. 9, Tafel II) neben kleinen Blättchen. Hiernach bestand die abgeschiedene Substanz aus dem in der Galle und der Muskelflüssigkeit[1]), besonders auch der kaltblütigen Tiere, vorkommenden Taurin (Aminoäthylsulfosäure). Dieses Taurin konnte auch in anderen Rogen (Herings-, Karpfenrogen, Störkaviar) in geringer Menge nachgewiesen werden.

Ein Teil der Aminosäurenlösung von Astrachankaviar wurde mit Bleiessig ausgefällt, nach Entfernung des Bleies mit Mercuriacetat und Natriumcarbonat versetzt und der Niederschlag durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde sodann abgedampft und in einer Lösung von absolutem Alkohol mit Chlorwasserstoff gesättigt. Beim Erkalten schied sich eine geringe Menge von langen Nadeln ab, die beim Kochen mit Wasser in freies Glykokoll zerfielen, das an seiner Krystallform unter dem Mikroskop erkannt wurde.

Den Auszug aus Kabeljaueiern untersuchten wir auf Asparaginsäure, indem wir die Lösung mit Bleioxyd kochten, den Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegten, die abgeschiedene Säure in das Kupfersalz überführten und dieses sowie die freie Säure unter dem Mikroskop untersuchten. Das Kupfersalz zeigte nicht die für asparaginsaures Kupfer charakteristischen Krystalle, so daß auf die Anwesenheit von Asparaginsäure nicht geschlossen werden konnte. Auch ein schwer lösliches Zinksalz bildete sich nicht, so daß Glutaminsäure gleichfalls nicht vorlag.

Auf Pyrimidinderivate, die mit den Purinstoffen strukturverwandt sind, wurde ein Teil der Aminosäurenlösung aus

---

[1]) Vgl. auch T. Jona, Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 458, 1913: Über die Extraktivstoffe der Muskeln.

Kabeljaurogen geprüft. Wir versetzten einen Teil des Filtrates von der Phosphorwolframsäure-Fällung bei Kabeljaurogen mit Sibernitrat und überschüssigem Baryt, schwemmten den Niederschlag in heißer verdünnter Schwefelsäure auf und zerlegten mit Schwefelwasserstoff. Nach Entfernung der Fällung und des Fällungsmittels sowie der Schwefelsäure durch Baryt krystallisierte beim Einengen eine Substanz aus, die bei starker Vergrößerung aus vielen kurzen, dicken Nädelchen[1]), teilweise zu schönen Drusen angeordnet, bestand (vgl. Fig. 10, Tafel II). Sie löste sich leicht in heißem, schwer in kaltem Wasser. Bei Zugabe von Bromwasser wurde dieses sofort entfärbt. Mit Diazobenzolsulfosäure trat in natronalkalischer Lösung schöne Rotfärbung ein. Auch Sublimierbarkeit wurde festgestellt. Die nähere Untersuchung des Sublimates zeigte auch, daß dieses aus Drusen winzig kleiner, kurzer, mikroskopischer Nädelchen, also aus denselben Krystallen wie bei der Krystallisation aus Wasser, bestand. Eine Stickstoffbestimmung ergab: 23,2 $^0/_0$ (ber. 23,8). Hiernach ist es nicht zweifelhaft, daß das zuerst von Kossel und Neumann[2]) aus Thymusnucleinsäure gewonnene Thymin (5-Methyl-2-6-dioxypyrimidin) vorlag. Die erhaltene Menge betrug nach der Krystallisation 0,4015 g aus 1146 g Rogen.

Eine gedrängte Übersicht über das Vorkommen von Fleischbasen und Aminosäuren im Fischrogen gibt folgende Zusammenstellung:

Auszug von	Organische Trocken-substanz g	Xanthin-basen g	Kreatin und Kreatinin mit Chlorzink	Kreatin und Kreatinin mit Pikrinsäure und Natronlauge	Amino-säuren
Heringsrogen . . .	13,82	0,0530	einzelne Nadeln	Rotfärbung	Leucin (?) Taurin (wenig)
Karpfenrogen . .	6,90	0,0730	Krystall-büschel	"	Taurin (Spur)

[1]) Vgl. Wl. Gulewitsch, Zeitschr. f. physiol. Chem. 27, 294, 1899.
[2]) A. Kossel und A. Neumann, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 26, 2753, 1893; 27, 2217, 1894.

Auszug von	Organische Trocken-substanz g	Xanthin-basen g	Kreatin und Kreatinin mit Chlorzink	mit Pikrin-säure und Natronlauge	Amino-säuren
Hering („weiße Eier")	n. best.	0,0540	Drusen und Einzel-krystalle	Rotfärbung	l-Tyrosin
Karpfen (weiße Eier")	n. best.	0,0330	wenig Kry-stalle	„	—
Saiblingsrogen . .	26,56	Spur	Krystalle sehr schön ausgebild.	schwache Rotfärbung	—
Kabeljaurogen . .	129,11	3,1540	Anfangs runde, schlecht ausgebil-dete Krystalle, später deutlicher	sehr intensive Rotfärbung	(aus 1146 g Rogen) Thymin (0,4015 g)
Hechtrogen 66,78 g	n. best.	0,0096	—	Rotfärbung	—
Dorschkaviar . . .	18,96	0,0090	Einzelkrystalle	„	Taurin
Elbkaviar	12,25	0,0280	Drusen u. Nadeln	intensive Rotfärbung	—
Astrachankaviar .	8,73	0,0360	Einzelkrystalle	Rotfärbung	Taurin, (wenig)Glykokoll

4. Die Proteine des Fischrogens.

Hugounenq[1]) gewann aus den Rogen des Herings ein „Albumin-Clupeovin", das bei der Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure lieferte: Arginin, Histidin, Lysin, Tyrosin, Leucin, Aminovaleriansäure, Alanin, Serin, Phenylalanin und Asparaginsäure. Diese Spaltungsprodukte stimmen mit den Bausteinen des Hühnerei-Vitellins überein, nur wurden in letzterem auch noch geringe Mengen von Glykokoll gefunden.

Reife und unreife Barscheier untersuchte Olaf Hammarsten[2]). Er brachte durch 5 bis 10%ige Chlornatriumlösung Eiweiß in Lösung, das weder durch Dialyse noch durch Verdünnung mit Wasser ausgeschieden wurde. Bei der Extraktion der Eier mit reinem Wasser quollen sie stark auf, doch löste sich auch hier Eiweiß. Wie die Untersuchung ergab, bestand das Albumin des Barscheies zum allergrößten Teil

[1]) Über ein aus Fischrogen ausgezogenes Albumin, verglichen mit dem Vitellin des Hühnereies. Compt. rend. 143, 693 bis 694, 1906.

[2]) Zur Chemie des Fischeies. Chem. Centralbl. 1905, II; Skand. Arch. f. Physik 17, 113 bis 132. 5. IV.

aus einem vitellinähnlichen Nucleoalbumin. Zur Reindarstellung wurden die Eier mit Wasser verrührt, filtriert und mit Salzsäure das „Mucin" ausgefällt. Aus der Lösung wurde sodann durch Neutralisation mit Natronlauge das „Albumin" ausgefällt. Die neutrale Lösung desselben gerann nicht beim Sieden und enthielt keine Purinkörper, Phosphorgehalt wurde aber festgestellt.

Das „Mucin"[1]) wurde durch abwechselndes Lösen in Natronlauge und Fällen mit Salzsäure gereinigt. Das Produkt zeigte die Eigenschaften eines Mucins. Ferner wurde festgestellt, daß die Hülle der reifen Eier in der Hauptsache aus Mucinogen, das Eiinnere aus Mucin bestand.

Mit einem Eiweißstoff aus Karpfeneiern beschäftigte sich eingehend G. Walter[2]). Nachdem bereits Virchow, Lehmann, Dumas und Cahours die Eiweißnatur der Dotterplättchen festgestellt hatten, analysierten die Karpfeneier zuerst A. Valenciennes und Fremy. Aus der Lösung der Dotterplättchen in Wasser entstand durch stärkere Verdünnung ein Niederschlag, den sie Ichthulin nannten. Bei der Untersuchung der Eier anderer Fische wurde dieser Körper auch stets festgestellt. Das Ichthulin erwies sich als löslich nur in Salzlösung von ganz bestimmter Konzentration.

Das Ichthulin aus Salmenrogen, ausgewaschen mit Alkohol und Äther, erwies sich als löslich in Salz- und Phosphorsäure. Die Analyse ergab: $C = 52{,}5$ bis $53{,}3\,\%$; $H = 8{,}0$ bis $8{,}3\,\%$; $N = 15{,}2\,\%$; $P = 0{,}6\,\%$; $S = 1{,}0\,\%$; $O = 22{,}7\,\%$.

Die Untersuchungen dieses Ichthulins setzte Walter auf Anregung Kossels fort. Er konstatierte zunächst, daß im Rogen — verwendet wurden Karpfenrogen — von Oktober bis Februar die Eiweißausbeuten stiegen.

Die Behandlung geschah in der Weise, daß die Eier mit Sand zerdrückt und zu einem dünnen Brei angerührt wurden. Nach dem Kolieren fügte er viel Wasser zu und erhielt eine starke Trübung, die durch Einleiten von Kohlendioxyd allmählich flockig wurde. Durch Lösen in stark verdünnter Magnesiumsulfatlösung und Wiederausfällen wurde das Produkt

---

[1]) Vgl. unser Ichthulin.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 15, 477, 1891.

gereinigt, schließlich mit Alkohol und mit Äther ausgewaschen. Die Analyse ergab: C = 53,33%, H = 7,56%, N = 15,63%, O(S.P.Fe) = 23,48%.

Da dieses Verfahren etwas umständlich erschien, wurde ein neues Verfahren angewendet, das darin bestand, daß durch Ausschütteln des aus den Eiern erhaltenen Kolates mit Äther zunächst alles Fett[1]) entfernt wurde, worauf dann die durch viel Wasser entstehende Fällung leichter in ähnlicher Weise wie vorhin gewonnen werden konnte. Analyse: C = 53,52%; H = 7,71%; N = 15,64%; O = 22,19%; S = 0,41%; P = 0,43%; Fe = 0,10%.

Die Ausbeute betrug bis zu 8% des Rogens. Das Ichthulin war löslich in Säuren, Basen, Salzen, unlöslich in viel Wasser. Ebenso verlor es durch Liegen unter Wasser seine Löslichkeit in den vorhin genannten Stoffen. Gegen Lackmus verhielt es sich wie eine Säure.

Aus der zum Ausschütteln verwendeten Ätherschicht wurde noch ein Eiweißkörper isoliert, der wahrscheinlich ein verunreinigtes Ichthulin darstellte.

Durch die Einwirkung künstlichen Magensaftes auf das Vitellin wurde Paranuclein in einer Ausbeute bis zu 4% des Vitellins erhalten. Bei der Analyse dieses Körpers wurden folgende Werte gefunden:

C	H	N	S	P	O (+Fe)
47,98%	7,18%	14,66%	0,30%	2,42%	27,46%

Bei der künstlichen Verdauung von Karpfeneiern trat auch Lecithin auf; doch konnte bei der Verdauung des Ichthulins kein Cholin, der Bestandteil des Lecithins, gewonnen werden. Es wurde ferner ein Stoff erhalten, der Fehlingsche Lösung reduzierte, so daß Zucker vorhanden zu sein schien. Dieser wurde auch mit Phenylhydrazin in krystallinischer Form erhalten (doppeltbrechende Krystallnadeln, zu strahlig angeordneten Büscheln vereinigt).

Ein Ichthulin aus Kabeljaueiern gewann P. A. Levene[2]) auf folgende Weise: Die Eier wurden mit Sand verrieben, aus-

[1]) Nach unseren Versuchen konnte nur ein Teil des Fettes auf diese Weise ausgeschüttelt werden.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 281, 1901.

gepreßt und die Flüssigkeit mit 5 % Chlorammonlösung versetzt, alsdann mit Äther ausgeschüttelt und durch Verdünnen mit Wasser (20fache Menge) das Ichthulin niedergeschlagen. Durch abermaliges Lösen in Chlorammonium, durch Ausfällung und mehrmalige Wiederholung des Verfahrens, bis in der ausgefällten Flüssigkeit die Biuretreaktion nicht mehr eintrat, wurde der Stoff gereinigt. Eine Analyse ergab die Zusammensetzung des mit Alkohol und Äther entfetteten Proteins: C = 52,44 %; H = 7,45 %; N = 15,96 %; S = 0,92 %; P = 0,65 %; O (+ Fe) = 22,58 %.

Das Kabeljau-Ichthulin spaltete bei der Hydrolyse kein Kohlenhydrat ab; es wurde aber eine Substanz gewonnen, die in ihren Eigenschaften der Vitellinsäure[1]) ähnlich war. Analyse: C = 32,56 %; H = 6,00 %; N = 14,03 %; S = 0,146 %; P = 10,34 %.

Bei der Analyse der Eier des Schellfisches fanden P. A. Levene und J. A. Mandel[2]) eine Substanz[3]), aus der durch Hydrolyse u. a. Purin und Pyrimidinbasen entstanden. Von den letzteren wurden jedoch nur Cytosin und Uracil gefunden. Ferner wurde der Rogen auf Nucleinsäure verarbeitet, die durch wiederholtes Lösen und Fällen aber nicht biuretfrei erhalten werden konnte. Die Orcinprobe war positiv, und beim Erhitzen mit verdünnten Mineralsäuren wurden Purinbasen erhalten. Die Analyse des Cu-Salzes ergab folgende Werte: N = 13,28 %, P = 7,71 %, Asche = 25,43 %.

Die Zusammensetzung der kupferfreien Substanz war also: N = 14,24 %, P = 8,35 %.

Es wurde vermutet, daß eine Mischung von Ichthulinsäure mit Nucleinsäure vorlag (Biuretreaktion!).

Analyse der Purinbasen (40 g der Cu-freien Substanz), Guanin als Sulfat:

0,1375 g gaben 0,1361 g CO_2 und 0,0525 g H_2O.

---

[1]) Vitellinsäure wurde von Levene und Alsberg aus Hühnereivitellin durch Behandlung mit Ammoniak dargestellt. Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 543, 1901.

[2]) Über die Nucleinkörper der Eier des Schellfisches. Zeitschr. f. physiol. Chem. **49**, 262, 1907.

[3]) Wahrscheinlich Ichthulin.

Berechnet für $(C_5H_5N_5O)_2 . H_2SO_4 . 2 H_2O$:	Gefunden:
C = 27,75 %	C = 27,52 %
H = 3,68 %	H = 4,28 %
Berechnet für Adenin (freie Base):	Gefunden:
N = 57,85 %	N = 51,94 %.

Pyrimidinbasen (38 g des Cu-Salzes).

Es wurde 1 g Uracil gewonnen, aus 1 %iger Schwefelsäure umkrystallisiert für $C_4H_4N_2O$ gefunden: C = 43,30 % berechnet 42,82 %), H = 3,91 % (berechnet 3,59 %). Das Cytosin, als Pikrat gewonnen, wurde in das Chloroplatinat übergeführt, $(C_4H_5N_3O)_2PtCl_4 . 2 HCl$; gefunden 30,10 %, berechnet 30,84 % Pt.

Beim Versuch, das Silbersalz der Lävulinsäure darzustellen, wurde nur ein sehr geringer Niederschlag erhalten, der nicht weiter untersucht werden konnte.

Einen eigenartigen Eiweißkörper, das sog. „Percaglobulin", fand Carl Th. Mörner in den Eiern des Barsches[1]). Dieser Körper füllte einen Teil der Ovarialhöhle aus und machte wegen seines „adstringierenden" Geschmackes Kaviarpräparate aus Barschrogen ungenießbar. Die Substanz fiel mit viel Wasser aus, war aber in verdünnter Chlornatriumlösung wieder löslich[2]).

Dieses Percaglobulin besitzt außer seinem eigenartigen Geschmack noch die Eigenschaften der Fällbarkeit mit Salzsäure und gewissen Glykoproteiden und Polysacchariden. Mit Ovomucoid soll sich eine Verbindung bilden, in der sich das Percaglobulin den Gewichtsmengen nach zum Mucoid wie 1 zu 0,22 verhält. Dieses Additionsprodukt, dessen Entstehung als Reaktion auf die beiden Komponenten benutzt werden kann, erwies sich als unlöslich in Wasser und den meisten Salzlösungen, leicht löslich in Säuren, Basen und merkwürdigerweise Bariumsalz-, ferner Glycerin- und Zuckerlösung. Auch

---

[1]) Percaglobulin, ein charakteristischer Eiweißkörper aus dem Ovarium des Barsches. Zeitschr. f. physiol. Chem. 40, 429, 1903/04.

[2]) Eine Lösung kann man nach Mörner dadurch erhalten, daß man frische Ovarien zweimal mit $^{n}/_{10}$-Chlornatriumlösung gleichen Gewichts je 10 Minuten extrahiert. Die filtrierte Lösung enthält dann ca. 0,74 % Percaglobulin, 0,96 % Gesamteiweiß.

mit Glykogen, Pflanzenschleim und Stärkekleister wurden Niederschläge erhalten, die sich ähnlich verhielten.

Das Percaglobulin ging beim Ausfällen oder Konzentrieren sehr leicht in Percaglobulan über, das, unlöslich in Neutralsalzlösungen, sich in Bariumlösungen doch leicht löste, ferner in äußerst verdünnter Salzsäure oder Lauge und in zucker- oder glycerinhaltigen Flüssigkeiten.

Durch Kochen oder Behandeln mit starker Säure oder Lauge verliert das Percaglobulin seinen Geschmack.

Seine Funktion hängt vielleicht mit der eigentümlichen Eiablage des Barschweibchens zusammen. Soll doch dieses beim Laichen den Bauch gegen einen scharfen Gegenstand pressen, um das Ende der Eimasse zu befestigen, alsdann einen raschen Sprung machen, so daß die ganze Rogenhülse, die bis zu $1^1/_2$ m Länge messen kann, auf einmal herausläuft und hängen bleibt. Nun fand Hammarsten[1]), daß vollreife Barschrogen weniger Mucin enthalten als unreife, also verbindet sich vielleicht ein Teil des Mucins mit dem Percaglobulin zur Befestigung der Eihüllen.

In biologischer Hinsicht unterscheidet sich nach H. Kodama[2]) das Eiweiß des Störkaviars scharf von dem anderer Fischrogen, so daß es mit Hilfe der Präcipitations-, Komplementbindungsreaktion und des Anaphylaxieversuches leicht gelingt, Mischungen der einzelnen Rogen miteinander nachzuweisen. Die präcipitinogenen Eigenschaften der Rogenproteine gehen jedoch beim Erhitzen, bei den einzelnen Rogen verschieden rasch, verloren. Auch eine Verschiedenheit des Fischfleischalbumins vom Eialbumin läßt sich auf obigem Wege nachweisen.

Die nach oben beschriebenen Verfahren (S. 373 u. ff.) von uns aus Fischrogen und Kaviar gewonnenen lufttrockenen Proteine prüften wir zunächst auf ihren Gehalt an Sticktoff, Phosphor und Schwefel, während eine gleichzeitige Aschen- und Wasserbestimmung die Umrechnung der erhaltenen Werte auf organische Trockensubstanz ermöglichte:

---

[1]) Zur Chemie des Fischeies. Chem. Centralbl. 1905, II; Skand. Arch. f. Physik 17, 113 bis 132. 5. IV.

[2]) Arch. f. Hygiene 78, 247 bis 259, 1913.

Im lufttrockenen Protein:

Protein	Stickstoff %	Phosphor %	Schwefel %	Wasser %	Asche %
Ichthulin Hering	12,95	1,29	1,26	12,58	4,47
„ Karpfen . . .	13,51	0,48	0,82	13,75	1,74
„ Saibling . . .	14,18	0,70	0,86	7,97	1,35
„ Kabeljau . . .	14,56	0,64	1,05	8,02	0,87
„ Dorschkaviar .	12,80	0,56	1,69	11,61	3,88
„ Elbkaviar . .	15,02	0,83	0,65	7,46	0,58
„ Astrachankaviar	13,61	1,00	0,96	9,29	0,96
Albumin[1]) Hering	14,02	0,95	1,31	7,47	2,67
„ Kabeljau . . .	14,25	0,31	1,17	6,62	1,10
„ Dorschkaviar .	8,16	0,11	1,71	4,01	4,55
„ Elbkaviar . .	12,94	0,19	1,59	9,62	1,05
„ Astrachankaviar	11,45	0,44	1,64	1,47	1,72
Eischalen Saibling . . .	14,31	0,13	0,72	8,40	(1,17)[2])
Eihäute Kabeljau . . .	13,72	0,76	0,91	(9,27)[2])	3,00
Ichthulin (Mittel) . . .	13,80	0,79	1,04	10,10	1,98
Albumin (Mittel)[3]) . .	14,14	0,40	1,24	7,05	1,94

Im wasser- und aschefreien Protein:

Protein	Stickstoff %	Phosphor %	Schwefel %
Ichthulin Hering	15,52	1,56	1,55
„ Karpfen	15,95	0,56	0,96
„ Saibling	15,63	0,78	0,95
„ Kabeljau . . .	15,99	0,71	1,15
„ Dorschkaviar . .	15,15	0,67	2,00
„ Elbkaviar . . .	16,33	0,90	0,71
„ Astrachankaviar	15,16	1,11	1,07
Albumin Hering	15,60	1,05	1,46
„ Kabeljau . . .	15,44	0,34	1,28
„ Dorschkaviar . .	8,92	0,12	1,91
„ Elbkaviar . . .	14,73	0,21	1,75
„ Astrachankaviar	11,83	0,46	1,70
Eischalen Saibling	15,82	0,14	0,80
Eihäute Kabeljau . . .	15,64	0,84	1,03
Ichthulin (Mittel) . . .	15,70	0,89	1,18
Albumin (Mittel) . . .	15,52	0,44	1,37

Der nicht unbedeutende Phosphorgehalt der Proteine deutet auf das Vorhandensein von Nucleinsäuren hin. Da es uns nun nicht ausgeschlossen erschien, daß auch die Fischeier wie das

[1]) Das Albumin aus den Kaviarsorten lag nur in geringer Menge vor und war mit anderen Stoffen verunreinigt.

[2]) Einschließlich Fett (0,74% bzw. 1,90%).

[3]) Albumin aus Rogen mit Ausschluß des Kaviaralbumins. Vgl. Anm. 1.

Sperma Protamine enthalten könnten, suchten wir diese auf gleiche Weise wie beim Sperma zu isolieren. Zur Untersuchung dienten die Ichthuline von Hering und Karpfen und das Albumin von Heringseiern mit folgendem Ergebnis:

Substanz	Menge des Proteins (lufttrocken)	Stickstoffgehalt desselben		Extrahiertes „Protamin“	Darin Stickstoff
		vor der Extraktion	nach der Extraktion		
	g	%	%	g	%
Ichthulin Hering . .	20	15,52	15,41	0,0910	15,0
„ Karpfen . .	50	15,95	16,18	0,0175	8,6
Albumin Hering . .	25	15,60	14,97	0,1310	11,8

Ferner wurden noch 50 g Kaviar-Ichthulin nach vorstehendem Verfahren extrahiert; sie lieferten nur 0,3095 g extrahiertes „Protamin“, das nur 0,0102 g Stickstoff (= 3,3%) enthielt.

Nach diesen Versuchen ist also durch 1%ige Schwefelsäure ausziehbares Protamin im Ichthulin im Gegensatz zur Spermasubstanz nicht vorhanden. Die isolierten geringen Proteinmengen sind wahrscheinlich durch die Behandlung mit Säure gebildete Syntonine, verunreinigt durch sonstige Stoffe (Glykogen?).

Immerhin schien es mit Rücksicht auf die obenerwähnte Theorie A. Kossels[1]) über die Bildung der Proteine von Bedeutung, auf die Spaltungsprodukte der Proteine des Fischeies, insbesondere die basischen Bestandteile (Xanthinbasen, Hexonbasen) eingehender zu prüfen.

Um die bei der Hydrolyse der Proteine gebildeten Aminosäuren voneinander zu trennen, bediente sich E. Fischer[2]) der gebrochenen Destillation der Ester der Aminosäuren im Vakuum. Dieses Verfahren ist qualitativ und quantitativ das beste zur Isolierung der Monoaminosäuren, es verlangt aber zur erfolgreichen Durchführung größere Proteinmengen als Ausgangsmaterial und ist umständlich. Zur Abscheidung der Diamino-

---

[1]) Vgl. S. 374.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 153, 1901, u. folg. Bde. Vgl. J. König, Nahrungsmittelchemie III, 1. Tl.; E. Abderhalden, Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 2, 472, 1909; C. Oppenheimer, Handb. d. Biochemie 1, 357, 1908.

säuren (Hexonbasen) aus Eiweiß dient ein von A. Kossel[1]) angegebenes Verfahren, das auf der Abscheidung derselben durch Phosphorwolframsäure aus schwefelsaurer Lösung nach vorheriger Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure beruht.

Unsere Arbeitsweise war folgende:

Eine gewogene Menge Protein wurde mit der 10fachen Menge 33 $^0/_0$iger Schwefelsäure (sowie einige Proteine zum Vergleiche mit Salzsäure durch 6 stündiges Kochen) während 14 Stunden hydrolysiert, die Hydrolysenflüssigkeit auf ein bekanntes Volumen aufgefüllt und in einem aliquoten Teil Gesamtstickstoff, Aminosäurenstickstoff (Formolstickstoff) und Ammoniak bestimmt[2]), wobei sich nachfolgende Mengen ergaben:

Protein		Gesamtstickstoff (nach Kjeldahl) g	Gesamter Formolstickstoff g	Davon Ammoniakstickstoff (mit MgO) g	In Prozent des Ges.-Stickstoffs: Formolstickstoff	In Prozent des Ges.-Stickstoffs: Ammoniakstickstoff
Ichthulin	Hering	1,167	(0,706)[3])	0,03	(60,4)	(2,7)
„	Karpfen	3,690	(2,97)	(0,13)	(80,5)	(3,3)
„	Kabeljau	11,305	9,41	0,76	83,4	6,7
„	Saibliug	10,965	8,85	0,68	80,5	6,2
„	Dorschkaviar	2,344	1,90	0,16	81,2	7,0
„	Astrachankaviar	4,670	3,99	0,46	85,3	10,0
„	Elbkaviar	6,371	5,14	0,64	80,7	10,0
Albumin	Hering	1,148	(0,79)	(0,02)	(69,6)	(1,7)
„	Kabeljau	3,630	3,10	0,16	85,4	4,4
„	Elbkaviar	1,390	1,19	0,11	85,6	7,9
Eischalen	Hering	0,378	(0,37)	(0,04)	(97,0)	(1,5)
„	Karpfen	4,613	3,90	0,40	84,5	8,6
Mit Salzsäure hydrolysiert	Ichthulin Kabeljau	6,862	4,89	0,48	71,3	6,9
Mit Salzsäure hydrolysiert	„ Saibling	2,828	1,97	0,17	74,9	6,6
Mit Salzsäure hydrolysiert	Albumin Hering	2,420	1,86	0,12	76,9	4,9
Mit Salzsäure hydrolysiert	Eihäute Kabeljau	6,768	4,52	0,41	66,7	6,0

Unter Berücksichtigung der vier mit Salzsäure ausgeführten Hydrolysen ergibt sich die Tatsache, daß bei der Hydrolyse mit Schwefelsäure mehr Aminosäuren gebildet wurden als mit Salzsäure. Es ist also anzunehmen, daß in letzterem Falle die Hydrolyse weniger vollständig verlief. Immerhin zeigen die gefundenen Werte, daß bei weitem den Hauptbestandteil

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 165, 1900/01. Vgl. J. König, l. c.

[2]) Vgl. bei Sperma, S. 337.

[3]) Die eingeklammerten Zahlen sind, da eine zu geringe Menge Lösung, die für andere Bestimmungen fast aufgebraucht war, zur Untersuchung vorlag, unsicher.

der untersuchten Proteine Monoaminosäuren bilden, da sich der nicht mit Formol titrierbare Stickstoff außer auf Hexonbasen auch noch auf den sog. Huminstickstoff erstrecken kann.

Einen aliquoten Teil der mit Schwefelsäure ausgeführten Hydrolysenflüssigkeiten erwärmten wir alsdann mit Bariumcarbonat bis zur alkalischen Reaktion, nutschten ab und erschöpften die Barytmassen mit heißem Wasser, bis die Diazoreaktion verschwand.

Das gelöste Barium wurde alsdann mit möglichst wenig Ammoniumcarbonat ausgefällt, die Lösung mit Schwefelsäure neutralisiert und in der Siedehitze mit alkalifreiem Kupferbisulfit ausgefällt. Der Niederschlag, der die Xanthinbasen enthielt, wurde alsdann in beschriebener Weise (vgl. S. 361 ff.) weiter verarbeitet. Bezüglich der erhaltenen Mengen sei auf die unten folgende Tabelle verwiesen. Die Ichthuline von Herings-[1]) und Karpfen- sowie Saiblingsrogen ergaben eine Menge Xanthinbasen, die für eine genauere Untersuchung ausreichten.

0,0275 g Xanthinbasen aus Herings-Ichthulin enthielten 0,01135 g, entsprechend 41,2 % Stickstoff (Xanthin verlangt 36,9, Hypoxanthin 41,2 %), ein weiterer Teil gab, mit Salpetersäure zur Trockne verdampft und mit Natronlauge betupft, Rotfärbung.

0,0225 g Xanthinbasen aus Karpfen-Ichthulin enthielten 0,00812 g Stickstoff, entsprechend 36,1 %.

0,2055 g Xanthinsilber aus Saiblingsrogen hinterließen im Porzellantiegel verascht 0,1155 g Silber (ber. 0,1152); dieses wog, in Chlorsilber übergeführt, 0,1465 g (ber. 0,1521 g); 0,1135 g desselben Xanthinsilbers ergaben, nach Kjeldahl verbrannt, 0,01891 g Stickstoff (ber. 0,01657). Mit Salpetersäure abgeraucht und mit Natronlauge behandelt, trat schön rotviolette Färbung auf. Diese wurde auch in den Xanthinstoffen aus Dorschkaviar- und Störkaviar-Ichthulin beobachtet.

Das Filtrat vom Xanthinkupfer wurde alsdann durch Schwefelwasserstoff vom Kupfer und durch Erwärmen mit Bariumcarbonat von der schwefligen Säure befreit, wobei ein

---

[1]) Die Xanthinbasen aus Herings- und Karpfen-Ichthulin wurden zunächst mit Phosphorwolframsäure abgeschieden und die abgeschiedenen Basen mit Kupferbisulfit weiter behandelt.

Teil des Bariums in Lösung ging. (Bildung von Bariumsalzen der Aminosäuren.)

Die Lösung schied beim Einengen bis zur beginnenden Krystallisation nach mehrtägigem Stehen Krystalle von Aminosäuren ab; diese wurden abfiltriert, mit etwas Alkohol und Äther gewaschen und nach Habermann und Ehrenfeld[1]) mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Eisessig und Alkohol (95 %) bis zum Aufwallen gekocht, dann rasch abfiltriert und mit obiger Mischung nachgewaschen.

Der Rückstand löste sich leicht in heißem Ammoniak und schied daraus nach dem Erkalten nadelförmige Büschel (vgl. Fig. 11, Tafel II) ab. Getrocknet besaßen diese Krystalle charakteristischen Seidenglanz und gaben gelöst mit Natriumcarbonat und Diazobenzolsulfosäure intensive Rotfärbung. Beim Erhitzen einer Probe im Röhrchen trat der Geruch nach verbranntem Horn auf, während gleichzeitig Zersetzung eintrat. Beim Erwärmen mit Millons Reagens entstand Rotfärbung und nach einiger Zeit eine Abscheidung. Einige Krystalle wurden in konz. Schwefelsäure gelöst, die Lösung wurde $^1/_2$ Stunde bei Wasserbadtemperatur gehalten, mit Wasser verdünnt, durch Bariumcarbonat neutralisiert und konzentriert; sie zeigte, mit einer Spur Eisenchlorid versetzt, Violettfärbung (Pirias-Probe). Mit Formalin und der 50fachen Menge Schwefelsäure trat nach einigen Augenblicken weinrote Färbung ein, die durch Kochen mit Eisenchlorid in Grün überging [Denigès-Probe[2])]. Einige Kryställchen, in siedendem Wasser gelöst und mit wenig (1 %) Essigsäure versetzt, färbten sich beim Kochen auf tropfenweisem Zusatz von Natriumnitritlösung schön rot [Wursters-Probe[3])]. Ferner entstand beim Erwärmen mit konz. Salpetersäure eine schön gelbe Lösung, die auf Zusatz von Natronlauge in Orange überging (Xanthoproteinreaktion).

Aus allen diesen Reaktionen geht hervor, daß der abgeschiedene Körper Tyrosin[4]) war, dessen Menge durch Wägen ermittelt wurde[5]).

---

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 37, 24, 1902.

[2]) Compt. rend. 130, 583, 1900.

[3]) Centralbl. f. Physiol. 1, 193, 1888.

[4]) Nach der Krystallform das auch sonst aus Proteinen entstehende aktive l-Tyrosin.

[5]) Nach E. Abderhalden und D. Fuchs kann man l-Tyrosin

Die Mutterlauge von den Tyrosinkrystallisationen gab mit alkalischer Bleilösung gekocht, Schwärzung, wodurch die Anwesenheit von Cystin wahrscheinlich wurde. Dieses läßt sich nach Embden[1]) durch verdünnte Salpetersäure oder nach Friedmann[2]) durch Behandlung mit heißem $10^0/_0$igem Ammoniak vom Tyrosin trennen[3]), doch gelang es uns nicht, die charakteristischen Krystalle des Cystins (6 seitige Tafeln) zu erhalten, da es jedenfalls in zu geringer Menge vorhanden war.

Die in Eisessig-Alkohol löslichen Aminosäuren wurden auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft und der Rückstand aus alkoholischem Ammoniak krystallisieren gelassen. Die abgeschiedenen Krystalle zeigten unter dem Mikroskop teils das Aussehen zarter dünner Blättchen, mitunter zu Drusen angeordnet (vgl. Fig. 12, Tafel II), teils von weißen knollenartigen Gebilden, Formen, die dem Leucin eigen sind. Beim Erhitzen im Röhrchen sublimierte der Stoff fast völlig unter Verbreitung eines eigentümlichen, widrigen Geruches (Amylamin). Bei einem Protein (Eischalen von Karpfen) wurde eine Trennung des Leucins von seinen Homologen durch Überführung in das Kupfersalz und Behandlung desselben mit Methylalkohol versucht, wobei sich dasselbe zum Teil als löslich darin erwies; doch wiesen die aus dem Kupfersalz wieder hergestellten freien Aminosäuren in der Krystallform keine charakteristischen Unterschiede auf[4]).

---

durch einfache Krystallisation fast quantitativ (95 bis $99^0/_0$) aus Aminosäurenlösungen gewinnen, wenn man die Krystallisation so lange fortsetzt, bis in der Mutterlauge die Millonsche Probe nicht mehr eintritt, und wenn man durch Fällung mit Phosphorwolframsäure Sorge trägt, daß sich nicht leichtlösliche Tyrosinverbindungen mit den basischen Spaltungsprodukten der Proteine (z. B. Lysin) bilden, indem man gleichzeitig säure- und ammoniakhaltige Laboratoriumsluft (am besten durch Einengen der Mutterlauge im Vakuum) abhält. Dagegen liefert die colorimetrische Methode von Folin und Denis (Journ. of Biolog. Chem. 12, 245, 1912) bedeutend zu hohe Werte. Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 468 bis 473, 1913.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 32, 94, 1901.

[2]) Beiträge z. chem. Physiol. u. Pathol. 3, 15, 1903.

[3]) Auch Phosphorwolframsäure, die das Cystin allmählich krystallinisch fällt, kann nach Winterstein (Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 153, 1902) zur Abscheidung dienen.

[4]) Von den Kupfersalzen der Leucin-Homologen sind Isoleucin-

Aus der Mutterlauge von der Tyrosin-Leucin-Krystallisation schieden wir nach dem Verdünnen und der Zugabe von 5 % Schwefelsäure mit Phosphorwolframsäure die Hexonbasen ab, die wir nach Entfernung des gemeinsamen Fällungsmittels nach Kossel und Kutscher[1]) voneinander trennten.

Nach Zugabe von Silbersulfat oder Silbernitrat, bis eine Tüpfelprobe mit Barytwasser einen gelben Niederschlag zeigte, wurde die Lösung mit gepulvertem Baryt bis zur Sättigung versetzt, wodurch Arginin und Histidin als Silbersalze ausfielen, Lysin in Lösung blieb.

Zur Trennung des Histidins vom Arginin wendete Kossel anfangs Mercurichlorid an[2]), welches Verfahren sich aber als nicht quantitativ erwies. In den folgenden Jahren haben Kossel und Kutscher ein Verfahren bekannt gegeben, das auf der fraktionierten Fällung mit Silbernitrat und Baryt beruht und eine quantitative Trennung ermöglicht. Auf noch einfachere Weise erzielt man dieselbe durch Silbernitrat und Bariumcarbonat, wodurch Histidin vollständig, Arginin nicht gefällt wird. Mit Rücksicht auf diese Tatsachen verfuhren wir daher nach F. Weiß[3]) in folgender Weise:

Die mit verdünnter Schwefelsäure und Schwefelwasserstoff von Baryt und Silber befreiten Basen wurden mit Bariumnitrat versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand, dann wurde mit Bariumhydroxyd fast neutralisiert (bis zur schwachsauren Reaktion), eine ausreichende Menge Silbernitrat und aufgeschwemmtes Bariumcarbonat im mäßigen Überschuß zugegeben, anfangs im Wasserbade angewärmt, weiter auf freier Flamme aufgekocht und nach dem Erkalten filtriert. Der

---

kupfer und Valinkupfer in Methylalkohol löslich (etwa 1:50 bis 1:60). Diese können nach Levene und Slyke (Journ. of Biolog. Chem. 6, 395, 1909; vgl. C. Neuberg, Der Harn, S. 590 u. 598) durch Bleiacetat und Ammoniak nach bestimmter Vorschrift voneinander getrennt werden. Das Phenylalanin läßt sich nach E. Fischer (Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 151, 1901) noch in Mengen von 0,02 g, in verdünnter Schwefelsäure gelöst und mit etwas Kaliumbichromat gekocht, durch den sehr deutlichen Geruch nach Phenylacetaldehyd nachweisen.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 165, 1900/01.

[2]) Ebenda 22, 176, 1896/97.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 52, 107, 1907.

Niederschlag enthielt das Histidin als Silbersalz, das Filtrat das Arginin.

Das Histidin wurde sodann mit Schwefelwasserstoff in schwefelsaurer Lösung, Bariumhydroxyd und Kohlensäure in üblicher Weise in die freie Base und diese durch Neutralisation mit Salzsäure in das Chlorid übergeführt und als solches gewogen. Das Chlorid besaß, umkrystallisiert, das Aussehen dünner rhombischer Blättchen (vgl. Fig. 13, Tafel II). Die Base gab die für Histidin charakteristischen Reaktionen, insbesondere auch intensive Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure und Natriumcarbonat[1]).

Das Arginin wurde in vollständig analoger Weise wie das Histidin in die freie Base und diese in das Nitrat übergeführt, das in feinen Nädelchen, teilweise zu Drusen angeordnet, krystallisierte. Diese Verbindung wurde gewogen und dann mit Kupferhydroxyd in wässeriger Lösung gekocht, worauf aus der tiefblauen Lösung nach dem Einengen und Erkalten das Argininkupfernitrat in Drusen aus kleinen blauen Prismen krystallisierte.

Das durch Silbersalz und Baryt nicht gefällte Lysin wurde durch etwas Salzsäure vom Silber, durch Schwefelsäure vom Barium befreit und aus 5%iger schwefelsaurer Lösung durch Phosphorwolframsäure gefällt; der Niederschlag wurde in mehrfach beschriebener Weise zerlegt, die freie Base und aus dieser durch Anrühren mit einer alkoholischen gesättigten Pikrinsäurelösung, unter Vermeidung eines Überschusses, das Pikrat dargestellt, abfiltriert und gewogen.

Einen weiteren Blick in den Bau der Fischrogen-Proteine gewährten einige mit Salzsäure ausgeführte Hydrolysen, von denen oben bereits die Rede war[2]). Durch Sättigung der

---

[1]) Tyrosin gibt, wie erwähnt, eine ähnliche Reaktion, die aber nach vorherigem Schütteln mit überschüssigem Benzoylchlorid nicht mehr eintritt, während die Histidinreaktion hierdurch nicht beeinträchtigt wird. Da ferner im Proteinmolekül gebundenes Histidin die Reaktionsfähigkeit mit Diazobenzolsulfosäure nach Behandlung mit Benzoylchlorid verliert, hat man in der Diazoreaktion in Verbindung mit der Benzoylierung ein einfaches Mittel, um freies Histidin in einer Flüssigkeit nachzuweisen. K. Inouye, Zeitschr. f. physiol. Chem. 83, 79, 1913.

[2]) Siehe obige Tabellen S. 381.

Hydrolysenflüssigkeit mit Chlorwasserstoff und Abkühlen im Eisschrank ließ sich sowohl vor wie nach Behandlung mit Tierkohle keine Glutaminsäure gewinnen. Ebenso verlief ein Versuch, Glykokoll als Esterchlorhydrat darzustellen, erfolglos[1]). Auf Asparaginsäure prüften wir in der Weise, daß wir mit Bariumhydroxyd die Aminosäurenlösung alkalisch machten und mit einem mehrfachen Überschuß von Alkohol ausfällten. Die abgeschiedenen Barytsalze wurden alsdann in das Kupfersalz übergeführt und zur Krystallisation hingestellt. Nach mehrwöchentlichem Stehen trat auch hier keine Abscheidung von asparaginsaurem Kupfer ein[2]).

Außer diesen Amino- und Diaminosäuren kommen unter den Spaltungsprodukten nucleinsäurehaltiger Proteine noch die Pyrimidinderivate: Cytosin (6-Amino-2-Oxypyrimidin), Uracil (2,6-Dioxypyrimidin) und Thymin (5-Methyl-2,6-Dioxypyrimidin) vor. Von diesen wurden, wie erwähnt, von Levene und Mandel[3]) aus Schellfisch-Ichthulin Cytosin und Uracil gewonnen, doch ist anzunehmen, daß sie auch in anderen Fischrogen in weiter Verbreitung vorhanden sind.

Die genannten Pyrimidinderivate sind in kaltem Wasser schwerlöslich, werden durch Silbernitrat und Barytwasser[4]) oder durch ammoniakalische Silberlösung sowie durch Mercurisulfat vollständig gefällt. Sie geben die Reaktion mit Diazobenzolsulfo-

---

[1]) Es schieden sich zwar beim Einleiten von Chlorwasserstoff in die Lösung der Aminosäuren in abs. Alkohol Kryställchen ab, die aber reguläre Form besaßen und aus Ammoniumchlorid bestanden. Immerhin ist zu berücksichtigen, daß besagte Glykokollverbindung eine gewisse Löslichkeit in Alkohol besitzt, so daß nur auf die Abwesenheit größerer Mengen desselben geschlossen werden kann.

[2]) Außer darin, daß keine oder wenig Asparaginsäure in dem Protein vorhanden war, kann dieses seinen Grund in ungenügender Hydrolyse (vgl. S. 381) oder ebenfalls in dem weniger vollkommenen Abscheidungsverfahren haben. Zur sicheren Entscheidung dieser Frage dürfte das Ester-Destillationsverfahren von E. Fischer Bedeutung besitzen. Vgl. auch den Befund Hugounenqs in dem „Albumin-Clupeorin" S. 373.

[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 49, 262, 1907, vgl. S. 376.

[4]) Auch Leucin, Asparaginsäure u. a. Aminosäuren fallen nach Kutscher (Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 116, 1903) hierdurch aus, lösen sich aber im Überschuß des Baryts im Gegensatz zu den Pyrimidinderivaten (sowie Histidin, Arginin und Xanthinbasen).

säure teils in soda-, teils in natronalkalischer Lösung. Phosphorwolframsäure fällt nur das Cytosin[1]). Eine Trennung des Uracils vom Thymin gibt T. B. Johnson[2]) an.

Eine gedrängte Übersicht über die von uns aus den Fischrogen-Proteinen durch Hydrolyse mit Schwefelsäure gewonnenen Aminosäuren und Basen gibt folgende Tabelle:

Protein	Angewendete Menge (N × 6,25) g	Tyrosin %	Sonstige Aminosäuren[3]) %	Histidin %	Arginin %	Lysin %	Xanthinbasen[4]) %	Isolierte Aminosäuren %
Ichthulin aus Saiblingsrogen .	59,25	2,8	2,5	0,54	0,41	0,01	0,37	6,6
„ „ Kabeljaurogen .	59,35	5,4	2,6	0,55	0,54	0,02	Spur	9,1
„ „ russ. Kaviar . .	23,35	5,5	7,1	0,47	0,97	0,01	0,08	14,1
„ „ Elbkaviar . . .	31,86	2,5	3,1	—	—	—	Spur	5,6
„ „ Dorschkaviar . .	10,85	3,5	5,7	0,69	0,42	0,02	0,38	10,0
Albumin aus Kabeljau	16,34	1,8	4,1	0,31	0,44	0,03	Spur	6,6
„ „ Elbkaviar	6,60	8,6	8,8	0,82	0,92	0,07	„	19,2

Außer in diesen Proteinen wurde das Vorhandensein von Tyrosin und Leucin in den Eischalen von Karpfen sowie im Ichthulin von Karpfen festgestellt; letzteres enthielt auch Glutaminsäure[5]). Herings- und Karpfen-Ichthulin lieferten ferner an Xanthinbasen 0,66 bzw. 0,18 %. Das Herings-Albumin enthielt keine Xanthinbasen.

Es liegt auf der Hand, daß die gefundenen Werte, dem nicht quantitativen Verfahren entsprechend, nur Minimalwerte sein können; jedenfalls zeigen sie in Einklang mit den durch die Formoltitration erhaltenen Zahlen, daß die basischen

[1]) Das Cythosin erscheint also in der Histidinfraktion, aus der es durch Mercurisulfat getrennt werden kann. (Kossel und Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 50, 1903.)

[2]) Journ. of Biol. Chem. 4, 407, 1908.

[3]) Soweit sie mit dem Tyrosin zusammen auskrystallisierten, in der Hauptsache: Leucin.

[4]) Die stark wechselnden Mengen lassen vermuten, daß die Xanthinbasen nicht dem Proteinmolekül angehörten, sondern bei ihrer Schwerlöslichkeit der Kaltwasserextraktion entgingen und somit nur eine Verunreinigung der Proteine darstellten.

[5]) Durch Einleiten von Chlorwasserstoff in das Filtrat vom Leucin gewonnen.

Spaltungsprodukte nur einen kleinen Teil des Proteinmoleküles ausmachen.

5. Fette, Säuren und Mineralstoffe.

Die in beschriebener Weise[1]) aus den Alkohol- und Ätherauszügen gewonnenen Fette der Fischrogen und Kaviarsorten wurden auf gleiche Weise wie das Fett aus Fischsperma auf Jodzahl, Verseifungszahl, Unverseifbares, Phosphor- und Stickstoffgehalt untersucht. Hierbei fanden wir folgende Zusammensetzung[2]):

Fett aus	Jodzahl (% Jod)	Verseifungszahl (mg KOH auf 1 g Fett)	Angewendete Menge Fett	Unverseifbares Cholesterin		Lecithin				
						Phosphorgehalt		Diolein-Lecithin	Stickstoffgehalt	
						angewendete Menge Fett	Phosphorsäure		gefunden	berechnet
			g	g	%	g	g	%	%	%
Saiblingsrogen . .	**128,3**	**181,8**	42,70	2,7840	**6,52**	7,150	0,2597	**41,10**	0,81	0,71
Karpfenrogen . . .	**78,9**	**186,9**	30,03	3,3000	**10,98**	3,167	0,1659	**59,19**	1,22	1,09
Heringsrogen . . .	**123,1**	**230,6** (?)	11,05	0,7670	**6,94**	1,730	0,0667	**43,61**	0,81	0,73
Kabeljaurogen . .	**148,4**	**176,1**	44,65	5,3790	**12,05**	6,695	0,2083	**35,19**	0,95	0,60
Russ. Kaviar . . .	**133,9**	187,1	31,44	1,2420	**3,91**	6,020	0,0568	**10,67**	0,38	0,19
Elbkaviar	**107,6**	**191,4**	13,62	0,5925	**4,35**	2,850	0,0325	**12,92**	0,29	0,23
Dorschkaviar . . .	**164,4**	**175,3**	6,43	0,9005	**14,00**	1,477	0,0013	**0,96**	0,37	0,02

Wie ersichtlich, sind die Fischrogenfette durch eine hohe Jodzahl und demgemäß einen hohen Gehalt an ungesättigten Fettsäuren ausgezeichnet. Sie weichen hierin, wie auch das Spermafett, nicht von den Fischölen[3]) ab. Merkwürdigerweise besaß aber das Fett aus Dorschkaviar gegenüber den anderen

---

[1]) Vgl. S. 347 u. ff.

[2]) Zum Vergleiche sei die Zusammensetzung des aus Hühnereiern gewonnenen Eieröls hier mitgeteilt (vgl. J. König, Die Untersuchung landwirtschaftlich und gewerblich wichtiger Stoffe **1906**, 544): Verseifungszahl 184 bis 191; Jodzahl 69 bis 82; Unverseifbares 4,50 %. Es enthält aus der von M. Gobley (Annal. chem. Pharm. **60**, 275) mitgeteilten Zusammensetzung des Eidotters berechnet: 24,1 % Lecithin, 4,0 % Glycerinphosphorsäure, 1,0 % Cerebrin, 1,7 % Farbstoffe.

[3]) Vgl. König und Splittgerber, Bedeutung der Fischerei, S. 107 bis 111.

trotz seiner hohen Jodzahl eine feste Konsistenz, in die es, auch beim Erkalten, sich leicht zurückverwandelte.

Die Verseifungszahlen stimmen gleichfalls mit denen der Fischöle im großen ganzen überein.

Der nicht unbeträchtliche (bei den fettarmen Rogen am größten) unverseifbare Bestandteil besaß nach mehrmaliger Umkrystallisation aus Alkohol den Schmelzpunkt 150° (korr.). Die Krystalle bestanden aus sehr dünnen rhombischen Tafeln, die sich auf dem Objektträger bei Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure karminrot und dann violett färbten; durch Zusatz von Jod traten auch grüne und blaue Färbungen auf. Eine Lösung der Krystalle in Chloroform wurde auf Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure blutrot bis purpurfarbig, in eine Schale ausgegossen, mit der Zeit blaugrün und gelb gefärbt; die Schwefelsäure zeigte deutliche grüne Fluorescenz (Salkowskis Probe[1]). Einige weitere Krystalle, in Chloroform gelöst, mit einigen Tropfen Essigsäureanhydrid und tropfenweise mit Schwefelsäure versetzt, durchliefen folgende Farbenskala: rosenrot-blau-grün (Liebermann-Burchardsche Probe[2]). Mit etwas Salpetersäure abgeraucht und warm mit Ammoniak betupft, färbte sich die Substanz rot. Da endlich bei der Krystallisation aus Eisessig sich schöne nadelförmige Krystalle bildeten, konnte mit Sicherheit geschlossen werden, daß der unverseifbare Anteil der Fette wesentlich aus Cholesterin bestand.

Wie ein Blick auf obige Tabelle zeigt, stehen Phosphor- und Stickstoffgehalt zueinander in naher Beziehung. Daß der letztere höher ist als der aus dem Phosphorgehalt berechnete, rührt ohne Zweifel daher, daß außer dem Lecithin noch andere ätherlösliche Stickstoffverbindungen (Cerebrin, Trimethylamin usw.) im Rogen vorhanden sind, von denen sich das Trimethylamin auch schon durch den Geruch verriet.

Der Gehalt der Fette aus Fischrogen an Lecithin errreicht also derartig hohe Werte, wie man sie bei anderen Fetten aus dem Tier- und Pflanzenreich bisher noch nicht beobachtet hat.

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 6, 207.

[2]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. 18, 1804, 1885. — Burchard, Diss. Rostock 1889.

Diese bemerkenswerte Tatsache dürfte in Zukunft für die Lecithin-Herstellung von einiger Bedeutung werden, zumal billige Fischrogen in großen Mengen[1]) zur Verfügung stehen.

Die Bestimmung der freien Säuren im Kaviar und Fischrogen erfolgte nach dem bei Wurst üblichem Verfahren, indem wir die wasserlösliche Säure auf Milchsäure, die wasserunlösliche auf Ölsäure berechneten, hierbei ergaben sich folgende Werte:

Bezeichnung	Untersuchte Menge g	Alter des Rogens	Milchsäure g	Ölsäure g	Gesamt-Säuren %
Saiblingsrogen. .	9,8000	frisch	0,19	0,20	0,39
Hechtrogen . . .	11,8440	"	0,22	0,27	0,49
Kabeljaurogen .	12,3400	einige Tage[2])	0,43	0,21	0,61
Elbkaviar	7,9785	unbekannt	0,52	1,91	2,43
do.	8,3490	nach 33 Tagen	0,52	2,48	3,00
do.	7,3000	nach weiteren 28 Tagen	0,34	2,32	2,66
Dorschkaviar . .	4,8140	unbekannt	1,26	2,28	3,54
do. . .	5,9400	nach 17 Tagen	1,29	2,82	4,11
do.[3]) . .	6,5130	nach weiteren 33 Tagen	1,38	2,45	3,83
do. . .	4,4940	" " 28 "	1,16	2,51	3,67
Astrachankaviar	5,0335	unbekannt	0,50	1,57	2,07
do.	4,8945	nach 17 Tagen	0,52	1,95	2,47
do.	6,5015	nach weiteren 33 Tagen	0,48	2,10	2,58
do.[4])	10,5715	" " 28 "	0,33	2,82	3,15

Der frische Rogen enthält nur geringe Mengen freier Säuren. Beim Aufbewahren nehmen die wasserunlöslichen Säuren, solange nicht Schimmel und Fäulnis eintreten, zu, während der Gehalt an Milchsäure sich nicht wesentlich ändert, der Gehalt an freien Fettsäuren kann also für das Alter eines Kaviars als Maßstab dienen. Immerhin sind die selbst ge-

---

[1]) Gewaltige Mengen Rogen werden beim Sardinenfang verwendet; diese kosten die Tonne = 1000 kg 12 bis 34 M., also 1 kg = 0,012 bis 0,034 M.

[2]) Die Eihäute waren sehr schwach angefault (am Geruch zu erkennen), der Rogen selbst kaum.

[3]) Hier war teilweise Schimmelbildung eingetreten; deswegen wurde etwas Chloroform zugefügt.

[4]) Hier war Fäulnis eingetreten.

fundenen Säuremengen durchweg höher als die von W. Niebel[1]) im noch genießbaren Kaviar angegebenen, nämlich:

	Russischer Kaviar %	Deutscher Kaviar %	Amerikanischer Kaviar %
Freie Fettsäuren . .	0,16 bis 0,51	0,98 bis 4,31	1,24 bis 6,76[2])

E. Rimini[3]) will für unverdorbenen Kaviar einen Gehalt an freien Säuren, berechnet als Olsäure, bis zu 6 % zulassen; doch dürfte bei einem so hohen Säuregehalt meistens auch Zersetzung eingetreten sein. Interessant ist die Ansicht von Schneider-Riga[4]), daß die freien Fettsäuren sich bei einer Art Reifungsprozeß des Kaviars bilden müssen und dadurch den bekannten pikanten Geschmack desselben bewirken; ganz frischer Preßkaviar soll leicht etwas fade schmecken.

Eine Analyse der Mineralstoffe des Kaviars geben A. Albu und C. Neuberg[5]) wie folgt an:

Frisch. Wasser	Gesamt-Asche	In Prozenten der Asche: K_2O	Na_2O	CaO	MgO	Fe_2O_3	P_2O_5	Cl	SO_3
50,2	7,70	3,33	30,77	5,02	—	0,22	10,55	47,44	0,98

Da die direkte Veraschung des Kaviars und Fischrogens wegen seines hohen Gehalts an Phosphor und Schwefel einmal ungenau[6]), dann aber auch wegen der entstehenden, schwer verbrennlichen Kohle[7]) mit Schwierigkeiten verbunden ist, wendeten wir zur Bestimmung der Basen die Säuregemischveraschung von A. Neumann[8]), nach der man diese in schwefelsaurer Lösung erhält, an und bestimmten Phosphor und Schwefel durch Schmelzen des getrockneten Rogens mit Kaliumhydroxyd und Salpeter im Nickeltiegel[9]). Das Chlor wurde in der durch direkte Verbrennung erhaltenen Asche bestimmt.

---

[1]) J. König, Die menschlichen Nahrungs- und Genußmittel, 1904, II, 572.

[2]) Vgl. auch die Werte von E. Rimini, S. 353.

[3]) Staz. sperim. agrar. Ital. 36. 249. — Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 7, 232, 1904.

[4]) Allgemeine Fischereizeitg. 20, 512, 1912.

[5]) Physiol. u. Pathol. d. Mineralstoffwechsels, S. 240 ff. Berlin 1906.

[6]) Vgl. A. Juckenack, Zeitschr. f. Nahrungs- u. Genußmittel 2, 905, 1899.

[7]) Platingeräte werden durch dieselbe sehr stark angegriffen.

[8]) Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtlg., 1900, 159.

[9]) In einigen Fällen (besonders im Anfange) eintretendes starkes Schäumen ließ sich durch Zugabe von etwas Paraffin beseitigen.

So erhielten wir folgende Werte[1]):

Nummer	Rogen	Darin Wasser	Gesamtasche		In Prozenten der Gesamtasche							
			darin direkt bestimmt	berechnet (durch Addition d. Bestandteile)	$K^{\cdot}$	$Na^{\cdot}$	$Mg^{\cdot\cdot}$	$Ca^{\cdot\cdot}$	$Fe^{\cdot\cdot\cdot}$	SO_4''	PO_4'''	Cl'
1	Hechtrogen	66,53	2,06	2,87	11,11	7,14	2,01	4,47	0,03	26,01	47,45	1,78
2	Kabeljaurogen I	72,10	2,13	3,97	6,24	4,64	1,97	4,67	0,10	30,57	46,99	4,82
3	" II	73,98	1,24	2,19	7,37	8,61	0,19	0,71	0,04	22,31	48,67	12,10
4	Elbkaviar	55,53	6,21	9,53	1,49	28,81	1,38	0,78	0,02	10,05	13,05	44,42
5	Dorschkaviar	59,39	9,81	13,00	1,48	27,73	1,11	0,84	0,21	12,87	12,98	42,78
4	Dorschkaviar (Auf kochsalzfreie Asche berechnet)	—	—	—	5,58	—	5,20	2,94	0,06	37,30	48,92	—
5	Elbkaviar . . (Auf kochsalzfreie Asche berechnet)	—	—	—	5,02	—	3,76	2,85	0,71	43,64	44,20	—

Die Addition der Basen- und Säure-Ionen ergibt folgende Werte:

	Hechtrogen	Kabeljaurogen I	Kabeljaurogen II	Elbkaviar	Dorschkaviar
Basen-Ionen . . .	31,21	24,16	18,19	36,62	33,11
Säure-Ionen . . .	196,45	212,11	202,73	103,67	108,46

Hiernach überwiegen die Säure-Ionen bedeutend die Basen-Ionen, und das hat seinen Grund darin, daß das Fischei, wie wir gesehen haben, eine bedeutende Menge organisch gebundenen Schwefel und Phosphor in Form von Lecithin und Proteinen enthält.

6. Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Der deutsche Handel mit Kaviar und Fischrogen hat eine nicht geringe Bedeutung.

2. Das Fischei enthält, bei einem verhältnismäßig geringen Wassergehalt (geringer als beim Hühnerei), Fleischbasen und Aminosäuren, an Eiweißstoffen wasserunlösliches Ichthulin (vorherrschend) und wasserlösliches Albumin, sowie je nach der Fischart stark wechselnde Mengen Fette.

[1]) Bei den Kaviarsorten sind die Werte für Mg jedenfalls durch den Magnesiumgehalt des zugefügten Kochsalzes erhöht, ebenso kann das Eisen teilweise aus dem Verpackungsmaterial (Blechbüchsen!) stammen. Bei Nr. 4 und 5 wurde der Wert für Cl aus Na berechnet (als NaCl).

3. An Fleischbasen enthalten sämtliche von uns untersuchten Rogen, entgegen der Ansicht K. Linnerts, Xanthinstoffe und Kreatinin. An Xanthinstoffen wurden Xanthin und Hypoxanthin isoliert, an freien Aminosäuren mit Sicherheit nachgewiesen: Taurin, l-Tyrosin und Glykokoll, ferner auch Thymin.

4. Die Proteine des Fischeies enthalten reichlich Schwefel und Phosphor. Im Gegensatz zur Spermasubstanz läßt sich, auf gleiche Weise behandelt, aus den Ichthulinen kein Protamin gewinnen. Bei der Spaltung mit Schwefelsäure liefern die Ichthuline in Übereinstimmung mit den Angaben von Hammarsten sowie Levene und Mandel Purinbasen. Ichtuline und Albumine ergeben ferner an Aminosäuren Tyrosin und Leucin (Karpfen-Ichthulin auch Glutaminsäure), an Hexonbasen Arginin, Histidin und Lysin (letzteres wenig). Glykokoll konnte durch Krystallisation des Esterchlorhydrats nicht nachgewiesen werden.

5. Die Fette des Fischeies sind teilweise durch einen sehr hohen Gehalt an Lecithin (bis zu 59,19 %) ausgezeichnet und enthalten nicht unwesentliche Mengen Cholesterin (3,91 bis 14,0 %). Der Gehalt an Lecithin ist am höchsten bei den fettärmeren Rogen.

6. Kaviar und Rogen enthalten freie Säuren, die beim Aufbewahren bis zum Eintritt der Fäulnis zunehmen.

7. Bei den Mineralstoffen des Fischstoffes überwiegen die Säure-Ionen bedeutend die Basen-Ionen, was daher rührt, daß der Schwefel und Phosphor vorwiegend in organischer Bindung vorhanden sind.



Fig. 1. Kreatinin-Chlorzink.
(Heringssperma.)

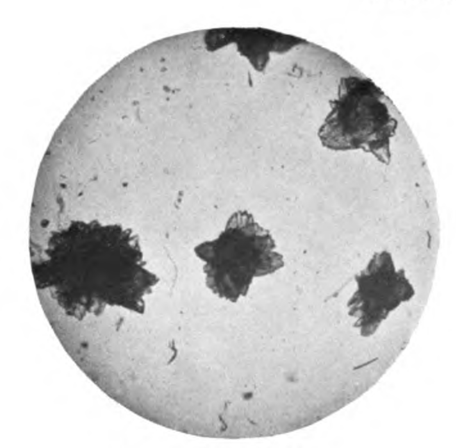


Fig. 3. Xanthinnitrat.
(Kabeljaurogen.)

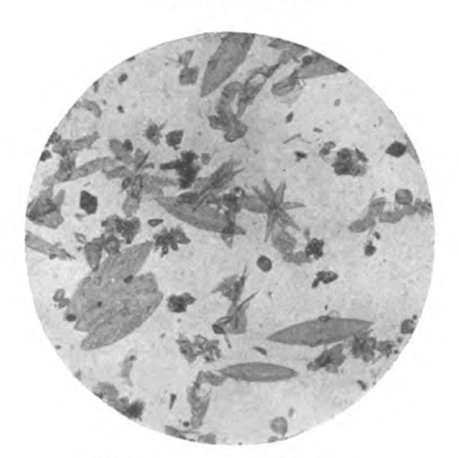


Fig. 4. Hypoxanthinnitrat.
(Kabeljaurogen.)

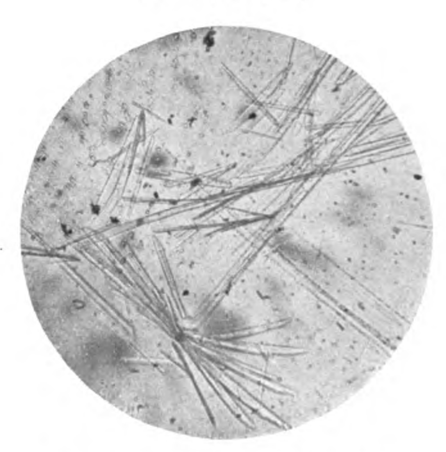


Fig. 5. Hypoxanthin-Silbernitrat.
(Kabeljaurogen.)

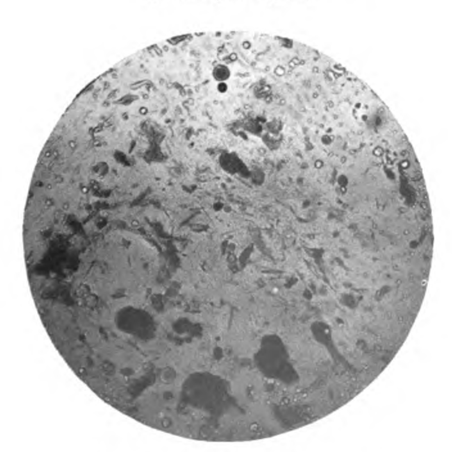


Fig. 6. Kreatinin-Chlorzink.
(Karpfenrogen.)

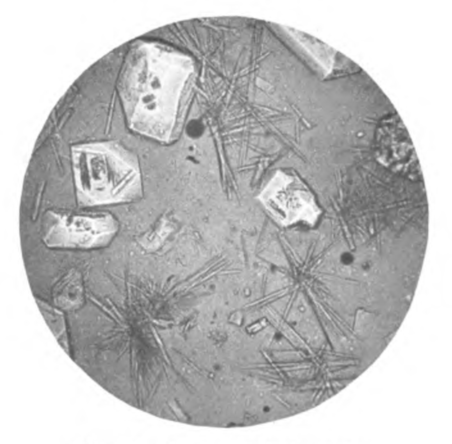


Fig. 7. Kreatinin-Chlorzink.
(Saiblingsrogen.)

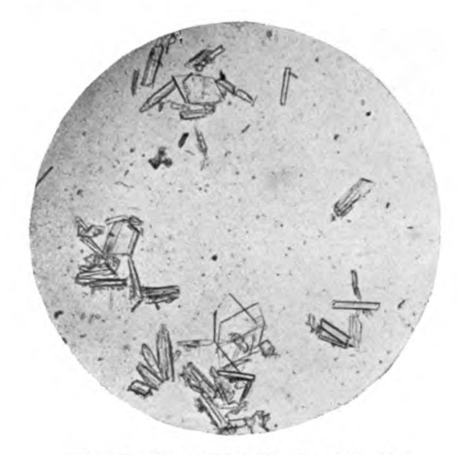


Fig. 8. Kreatinin-Hydrochlorid. (Heringsrogen.)

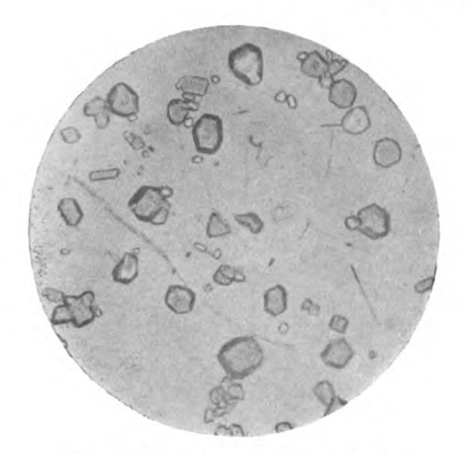


Fig. 9. Taurin. (Dorschkaviar.)

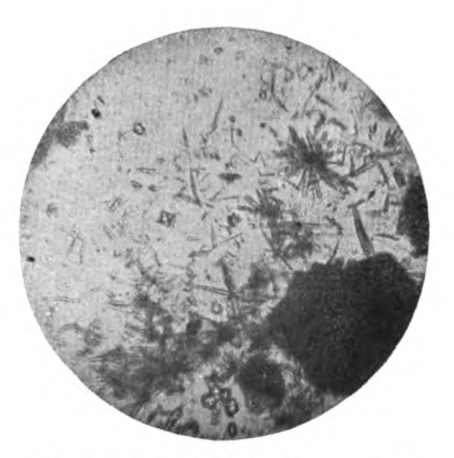


Fig. 10. Thymin. (Kabeljaurogen.)



Fig. 11. Tyrosin. (Karpfenrogen.)

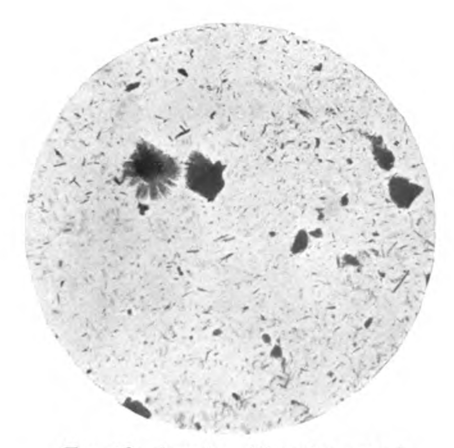


Fig. 12. Leucin. (Karpfenrogen.)



Fig. 13. Histidin-Hydrochlorid. (Fischrogen.)

Über Beeinflussung der Morphinwirkung durch die Nebenalkaloide des Opiums.

Von

R. Meissner.

(Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 15. Juli 1913.)

Mit 6 Figuren im Text.

In einer Arbeit des vorigen Jahres hat W. Straub[1]) die Aufmerksamkeit auf die wichtige Frage gelenkt, ob es möglich sei, den Effekt eines stark wirkenden Alkaloids durch die Gegenwart eines zweiten indifferenten potentiell zu steigern.

Dieses Prinzip ist von großer Bedeutung, da es auf einem solchen Wege möglich wäre, optimal wirkende Alkaloidgemische darzustellen, Tatsächlich wurden bereits zwei Präparate, das Narkophin und das Laudanon, auf Grund dieser Überlegung geschaffen. In beiden soll das Narkotin das indifferente Alkaloid sein, das die Wirkung des Morphiums potenziert. Straub sieht in dem Narkophin die derzeitig rationellste Lösung des Opiumproblems. Andere Autoren halten das Pantopon für den besten Opiumersatz. Die Literaturangaben reden teils dem einen, teils dem andern dieser beiden Arzneimittel das Wort. Soviel scheint aber festzustehen, daß die rein narkotische Wirkung auf das Großhirn bei Pantopon wie bei Narkophin ungefähr gleich stark ist. Zum Beispiel berichtet v. Issekutz[2]) von Froschversuchen, bei denen ein Gemisch von Narkotin + Morphin (aus dem neben Meconsäure das Narkophin besteht) eine im Verhältnis zu reinem Morphin sehr gesteigerte Narkose ausübt. Dieselbe trat bei einem Gemisch von Narkotin + Morphin + Papaverin (die alle drei im Pantopon enthalten sind) noch etwas stärker auf, und reines Pantopon rief bei Fröschen ebenfalls eine sehr starke narkotische Wirkung hervor. Barth[3]) konnte diese Versuche bestätigen. Er gibt an,

---

[1]) Die pharmakodynamische Wirkung des Narkotins im Opium. Diese Zeitschr. **41**, 419.

[2]) Arch. f. d. ges. Physiol. **145**, 415.

[3]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. **70**, 258.

daß von Morphin 0,3 mg pro Gramm Tier nötig sind, um eben die Rückenlage zu ertragen, von Pantopon nur 0,15 mg. Narkoseversuche am Menschen, die meist nur mit einem dieser beiden Opiumersatzmittel angestellt wurden, scheinen die gesteigerte Wirkung im Verhältnis zum Morphingehalt nicht zu zeigen. Von den wenigen Arbeiten, die wirkliche Vergleiche mit beiden ausführten, seien hier die Untersuchungen von Zehbe[1]) genannt, der urteilt, daß das Narkophin dem Pantopon am nächsten stehe und sich von diesem nur in einigen Fällen durch geringere Nebenwirkungen unterscheide. Er gab 15 bis 30 Tropfen einer 3%igen Lösung 3 mal am Tage, oder subcutan 0,03 g; d. h. die dreifache Menge der gewöhnlichen Morphindosis. Eisner[2]) erzielte zwar des öfteren mit geringeren Narkophindosen (Tabletten à 0,015, Injektion von 0,015 bis 0,03, 15 bis 20 Tropfen einer 2%igen Lösung) gute Wirkungen. Er gebrauchte und empfiehlt aber Narkophin vor allem als Hustenmittel, und da ist zu bedenken, daß gerade zu solcher therapeutischen Verwertung auch Morphin und Pantopon in geringeren (als den oben erwähnten normalen) Dosen wirksam sind. Ferner ist nicht ersichtlich, wie oft Eisner die oben genannten Dosen pro die verordnete, und schließlich sagt er selbst, daß er manchmal mit diesen Quantitäten nicht auskam und zu höheren greifen mußte. Auch aus den zahlreichen Narkoseversuchen mit Laudanonpräparaten an Menschen, über die Faust[3]) berichtete, geht nur hervor, daß diese Alkaloidgemische ungefähr so stark wirken wie das Pantopon, einige Male etwas stärker, andere Male etwas schwächer.

Eine subcutane Narkophindosis zu 0,03, die an reinem Morphin 0,01 enthält, wirkt ohne weiteres durch ihren Morphingehalt, wie schon von Bürgi[4]) hervorgehoben wurde. Hierbei kann von einer Potenzierung durch Narkotin gar keine Rede sein. Straub hat nun derartige Narkoseversuche am Menschen nicht in den Bereich seines Urteils über die potenzierende Kraft des Narkotins auf die Morphinwirkung gezogen. Abgesehen von Toxizitätsbestimmungen an Mäusen und einer biologischen Reaktion an der gleichen Tierspezies, prüfte er die narkotische Wirkung, die Narkophin auf Katzen und auf das Atemzentrum von Kaninchen ausübt. Er fand, daß der Effekt, den Morphin bei Katzen erzeugt, durch Narkotin — im Sinne einer Narkose — potenziert wird. Der Widerspruch, der sich hier in der Wirkung auf Katzen gegenüber der Wirkung auf den Menschen zeigt, gab mir Veranlassung, mich über die obige prinzipielle Frage zu orientieren.

Es interessierte mich ferner zu erfahren, wie Pantopon und Laudanon sich in dieser Hinsicht verhalten und ob diese Substanzen ebenfalls, wie Straub es vom Narkophin angibt, das

[1]) Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 28.
[2]) Therapeut. Monatshefte 1913, Nr. 5.
[3]) Münch. med. Wochenschr. 1912, Nr. 46.
[4]) Medizin. Klinik 1912, Nr. 50/51.

Atemzentrum von Kaninchen weniger narkotisieren als Morphin. Mit letztgenannten Untersuchungen begann ich diese Arbeit.

I. Bestimmung des Atemvolumens und der Atemfrequenz nach Morphin, Narkophin, Pantopon, Laudanon und darauffolgender Reizung mit Cocain.

Methodik.

Straub benutzte die erregende Wirkung einer $10^0/_0$igen Kohlensäureatmosphäre auf morphinfreie und morphinisierte Tiere, um zu messen, wie sich dieselben verhalten, wenn man 1. vor der Morphininjektion sie mit Narkotinhydrochlorid behandelt, und 2. wenn man ihnen anstatt Morphin die entsprechende Dosis Narkophin injiziert. Watkyn-Thomas[1]) hat die Reizung des zentralen Ischiadicusstumpfes zu ähnlichem Zweck gewählt. Ich verglich zunächst die Wirkung dieser Alkaloidpräparate so, wie sie für die Praxis mir am wichtigsten erscheint: in bezug auf Änderung der Atemfrequenz und des Atemvolumens, ohne irgendeine Reizquelle hinzuzufügen. Hatte ich dann die Änderung der Atemtätigkeit wahrgenommen, so reizte auch ich das Atemzentrum, und zwar mit einem Antagonisten des Morphins: mit Cocain. Es ist mir sehr wohl bekannt, daß dieses Alkaloid nicht sehr lange im Körper unverändert bleibt, aber eine große Versuchsreihe zeigte mir, daß es regelmäßig auf das Atemzentrum erregend wirkt und bei derartigen Versuchen sehr verläßlich ist. Die reinen Alkaloide wurden von E. Merck-Darmstadt, die Alkaloidgemische Narkophin, Pantopon, Laudanon I des öfteren frisch von hiesigen Apotheken bezogen.

Versuchstiere waren Kaninchen von ca. 2 kg Gewicht; injiziert wurden genau dem Morphingehalt entsprechende Lösungen der Alkaloidgemische. Injektionsort: Vena facialis anterior. Die operierten Tiere blieben in einem besonders ruhigen Raum, gut in Tücher gehüllt, aufgespannt, und erst nachdem volle Beruhigung und Gleichmäßigkeit in bezug auf Atmungstätigkeit eingetreten war, wurde der Versuch begonnen. Dieses Moment ist durchaus nicht gleichgültig, da man bei seiner Außerachtlassung zu den widersprechendsten Resultaten kommen kann.

[1]) Biochem. Journ. 6, 4.

In der ersten Versuchsreihe wurden Atemvolumen und Atemfrequenz gleichzeitig verzeichnet. Die tracheotomierten Kaninchen atmeten durch Ventile und waren mit einer Gasuhr verbunden; die Verzeichnung der Respiration wurde automatisch mittels des Pneumographen durchgeführt. Ich nehme Abstand, meine Ergebnisse in Diagrammen auszudrücken und lasse lieber allein die Zahlen sprechen. Bei der Bedeutung der in Besprechung stehenden Frage habe ich eine große Zahl von Einzelversuchen durchgeführt, die, ohne Auswahl, sämtlich wiedergegeben seien. Als Ausgangspunkt der folgenden Vergleichsbestimmungen wählte ich, dem Beispiel Straubs folgend, die Wirkung von 5 mg Morphin.

Versuchsreihe I.

Versuch	Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
1	1′—10′		597	10,5
a)	15′	5 mg Morphin[1]		
	17′—26′		260	6,0
	61′—70′		618	6,0
b)	75′	5 mg Morphin		
	77′—86′		143	4,0
	171′—78′		167	4,0
c)	182′	5 mg Cocainhydrochlorid		
	184′—91′		413	13—17
2	1′—10′		255	6,5
a)	12′	5 mg Morphin		
	14′—23′		117	4,5
	36′—45′		317	5,0
b)	47′	5 mg Morphin		
	49′—58′		209	5,0
	70′—79′		256	5,0
c)	81′	5 mg Cocain		
	83′—92′		308	10,0
3	1′—10′		262	6,5
a)	11′	5 mg Morphin		
	13′—22′		64	4,0
	152′—61′		225	5,0
b)	162′	5 mg Morphin		
	164′—73′		41	3,5
	229′—32′		158	5,0
c)	234′	5 mg Cocain		
	236′—39′		658	12,0

[1]) Sämtliche Lösungen wurden intravenös injiziert, wenn nicht „subcutan“ ausdrücklich vermerkt ist.

Versuchsreihe I (Fortsetzung).

Versuch	Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
4	1′—10′		378	7,0
a)	11′	1,6 cg Narkophin		
	13′—22′		114	5,0
	38′—47′		250	5,5
b)	48′	1,6 cg Narkophin		
	50′—59′		16	3,0
	70′—72′		200	4,0
c)	74′	5 mg Cocain		
	76′—78′		283	7,5
5	1′—10′		291	9,5
a)	11′	1,6 cg Narkophin		
	14′—23′		—	4,5
	83′—92′		96	5,5
b)	93′	1,6 cg Narkophin		
	95′—104′		10	4,0
	104′—106′		1	4,5
c)	107′	5 mg Cocain		
	109′—12′		30	12,0
	113′	5 mg Cocain		
	114′—17′		333	12,0
6	1′—6′		443	8,0
a)	8′	1,6 cg Narkophin		
	10′—15′		249	5,0
b)	16′	5 mg Cocain	(große Unruhe)	
	17′—22′		572	12,5
	94′—98′		237	4,0
c)	103′	1,6 cg Narkophin		
	104′—108′		145	3,0
d)	137′	5 mg Cocain		
	139′—43′		428	12,0
7	1′—10′		256	7,0
a)	12′	1 cg Pantopon		
	14′—23′		115	5,5
	63′—72′		207	6,5
b)	73′	1 cg Pantopon		
	75′—84′		53	4,0
	95′—104′		72	5,5
c)	105′	5 mg Cocain		
	107′—16′		171	12,0
8	1′—10′		642	12,0
a)	11′	1 cg Pantopon		
	14′—23′		335	6,0
	53′—60′		294	5,0
b)	61′	1 cg Pantopon		
	63′—70′		188	3,5
	75′—81′		380	4,5
c)	83′	5 mg Cocain		
	80′—91′		821	12,0

Versuchsreihe I (Fortsetzung).

Versuch	Zeit in Minuten	Injektion von	Atem-volumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atem-frequenz pro 10 Sek.
9	1′—10′		476	6,5
a)	11′	1 cg Pantopon		
	13′—22′		275	3,5
	38′—44′		278	3,0
b)	45′	5 mg Cocain		
	47′—53′		660	13,0
10	1′—10′		343	9,5
a)	13′	1 cg Laudanon I		
	15′—24′		30	6,5
	42′—48′		73	7,0
b)	49′	5 mg Cocain		
	52′—58′		151	14,0

Die Versuche der ersten Reihe ergeben wohl zwingend:

a) daß das Morphin, Narkophin und Pantopon das Atemvolumen deutlich verkleinern.

b) daß in bezug auf Herabsetzung der Atemfrequenz keine Unterschiede bestehen;

c) daß eine Differenz der Erregbarkeit gegenüber dem Cocainreiz nicht erweislich ist.

Gab ich Pantopon oder Narkophin in doppelter Dosis subcutan, so trat eine ganz ähnliche Wirkung ungefähr 10 Minuten später als bei intravenöser Injektion auf:

Versuchsreihe IIa.

Versuch	Zeit in Minuten	Injektion von	Atem-volumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atem-frequenz pro 10 Sek.
1.	1′—10′		642	7,0
	11′	3,2 cg Narkophin subcutan		
	20′—29′		405	4,5
	53′—62′		337	3,0
2.	1′—10′		501	6,5
	13′	2 cg Pantopon subcutan		
	24′—33′		295	4,0
	68′—72′		245	2,5

Zum Vergleiche prüfte ich schließlich noch den Einfluß von Codeinphosphat auf Atemvolumen und Atemfrequenz und konnte frühere Angaben bestätigen, in denen ein nur geringer Einfluß des Codeins auf das Atemzentrum festgestellt wurde.

Versuchsreihe IIb.

Versuch	Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
1	1'—10'		507	4,5
	11'	5 mg Codeinphosphat		
	13'—22'		475	4,0
	24'	1 cg Codeinphosphat		
	28'—37'		395	3,5
	37'—41'		438	4,0
	42'	5 mg Cocain		
	44'—48'		639	13,0

II. Atemfrequenzbestimmungen an demselben Tier.

Die vorstehenden Erfahrungen zeigen, daß ebenso wie nach Morphin (was ja längst bekannt war), auch nach den hier in Frage kommenden Opiumersatzpräparaten außer der Veränderung des Atemvolumens ein Sinken der Atemfrequenz konstant einhergeht. Konstant war ferner die Steigerung der Atemfrequenz nach intravenösen Cocaingaben.

Ich habe daher in den nächsten Versuchsreihen nur die Atemfrequenz bestimmt mit dem großen Vorteil, an ein und demselben Tiere nach einer Pause von mehreren Tagen die Einwirkung der in Frage stehenden Präparate prüfen zu können. Natürlich ist mir klar, daß ein Tier heute und nach einigen Tagen eigentlich nicht mehr dasselbe Tier ist, aber doch sind die Versuchsreihen untereinander wohl vergleichbarer, als bei verschiedenen Individuen. Ich band bei diesen Untersuchungen den Tieren eine sehr feine Kanüle in eine Ohrvene, spannte dieselben, die Bauchseite nach unten, auf ein Brett und ließ auch hier, nachdem ich für Ruhe und Wärme gesorgt hatte, die Atmung durch einen Pneumographen automatisch registrieren. Ein Kaninchen läßt sich zu solchen Versuchen bequem 4 bis 5 mal gebrauchen. Die hier gefundenen Zahlen bestätigen die Resultate der Versuchsreihe I.

Versuchsreihe III.

A. Tier Nr. 52, 2100 g.

Versuch 1. 29. XI.
Normal 10 = 5[1]).

6^{43}	1 cg Pantopon	10 = 3–3,5
6^{50}	5 mg Cocain	10 = 7,0
7^{48}		10 = 5,0
7^{49}	3 mg Cocain	10 = 7,5
7^{50}		10 = 5,0

Versuch 2. 5. XII.
Normal 10 = 7,5–8.

6^{23}	1,75 cg Narkophin	10 = 5–5,5
6^{51}	5 mg Cocain	10 = 9,0
7^{18}		10 = 5,5
7^{20}	5 mg Cocain	
7^{21}		10 = 8,0
7^{41}		10 = 6,0
7^{44}	3 mg Cocain	
7^{45}		10 = 7,0

Versuch 3. 11. XII.
Normal 10 = 7,5.

6^{12}	1,62 cg Narkophin	
6^{15}		10 = 5,5
6^{47}	5 mg Cocain, starke Erregung	
6^{48-50}		10 = 14
7^{16}		10 = 5,5
7^{19}	5 mg Cocain, stärkste Erregung, Atmung nicht zählbar	
7^{20}		10 = 5,5

Versuch 4. 17. XII.
Normal 10 = 7,5.

9^{12}	1 cg Pantopon	10 = 4,5
9^{42}	5 mg Cocain	10 = 12

B. Tier Nr. 23 (sehr unruhig), 2100 g.

Versuch 1. 28. XI.
Normal 10 = 10.

1^{11}	5 mg Morphin	
1^{12-20}		10 = 9,0
1^{43}		10 = 9,0
2^{00}	6 mg Cocain	10 = 13–14
2^{13-16}		10 = 10,0
2^{21}	5 mg Cocain	10 = 15,0

Versuch 2. 4. XII.
Normal 10 = 10.

6^{40}	1 cg Pantopon	10 = 8,0
7^{10}	6 mg Cocain	
7^{11}		10 = 12,0
7^{42}		10 = 10,0
7^{53}	5 mg Cocain	10 = 12,0
8^{00}		10 = 10,0
8^{02}	5 mg Cocain	10 = 11–12

Versuch 3. 10. XII.
Normal 10 = 10–10,5.

10^{55}	1,62 cg Narkophin	
10^{56}	starke Erregung des Tieres	10 = 14,0
10^{57}		10 = 14,0
10^{58}		10 = 11,5
10^{59}		10 = 8,5
	Von hier an dauernd	10 = 8,0
11^{24}	6 mg Cocain	
11^{25}		10 = 15,0
12^{17}		10 = 10,0
12^{27}	1,62 cg Narkophin	
12^{28}	Erregung	10 = 13,0
12^{29}		10 = 12,0
12^{30}		10 = 11,0
12^{48}		10 = 9,0
12^{49}		10 = 8,0
12^{50-56}		10 = 8,5

Versuch 4. 19. XII.
Normal 10 = 12.

1^{21}	5 mg Morphin	
1^{46}		10 = 8,5
1^{54}	1,62 cg Narkophin	
1^{55}	stärkste Erregung, Atemzüge nicht zählbar	
1^{56}		10 = 9,5
1^{58}		10 = 7,5

Versuche abgebrochen, da das Tier dauernd sehr unruhig ist.

---

[1]) Es bedeutet in dieser Tabelle 10 = 5: In 10 Sek. 5 Atemzüge.

C. Tier Nr. 33. 2000 g.

Versuch 1. 5. XII.
Normal 10 = 10.

12^{35}	1,75 cg Narkophin	10 = 8,0
12^{56}	5 mg Cocain	10 = 14,0
2^{24}		10 = 9,0
2^{25}	5 mg Cocain	10 = 14,0

Versuch 2. 11. XII.
Normal 10 = 8,5.

12^{20}	1,62 cg Narkophin	10 = 7,0
12^{23}		10 = 6,0
12^{25}		10 = 5,5
12^{44}	5 mg Cocain	
12^{47}		10 = 15,0
1^{21}		10 = 6,5
1^{26}	5 mg Cocain	10 = 12,5

Versuch 3. 19. XII.
Normal 10 = 7.

5^{59}	1,62 cg Narkophin	
6^{01}–6^{08}		10 = 5,5
6^{22}		10 = 4,5
6^{23}	5 mg Cocain	
6^{40}		10 = 11,5

Versuch 4. 30. XII.
Normal 10 = 7,0.

11^{17}	1 cg Pantopon	
11^{18}		10 = 5,0
11^{19}		10 = 4,5
11^{20}		10 = 5,0
11^{48}		10 = 4,0
11^{50}		10 = 4,5
11^{54}	5 mg Cocain	
11^{55}		10 = 8,0
11^{56}		10 = 10,0
12^{00}		10 = 8,0
12^{02}		10 = 8,0
12^{05}		10 = 7,5
12^{45}		10 = 5,5
12^{48}		10 = 5,5

D. Tier Nr. 48.

Versuch 1. 18. XI.
Normal 10 = 18 (Tier blieb dauernd sehr erregt).

10^{10}	5,5 mg Mo	10 = 5,0
10^{19}	3 mg Cocain	10 = 8,0
10^{31}		10 = 5,0

Versuch 2. 3. XII.
Normal 10 = 12.

3^{20}	1,0 cg Pantopon	10 = 7,0
3^{29}	3,0 mg Cocain	10 = 11,0
3^{51}		10 = 9,0
4^{15}	3,5 mg Cocain	10 = 12,0
4^{38}		10 = 9,0
4^{42}	4,5 mg Cocain	10 = 12–13
4^{56}		10 = 10,0

Versuch 3. 9. XII.
Normal 10 = 10,5.

1^{12}	1,62 cg Narkophin	
1^{15}		10 = 8,0
1^{17}		10 = 7,0
1^{18}		10 = 6,5
1^{21}	3 mg Cocain	
1^{35}		10 = 7,0
1^{50}		10 = 8,0
2^{05}		10 = 9,0
2^{35}		10 = 10,0
3^{00}		10 = 10,0
3^{03}	1,62 cg Narkophin	
3^{06}	(Erregung)	10 = 12,0
3^{11}		10 = 11,5
3^{12}		10 = 9,0
3^{27}		10 = 10,0
3^{33}	1,62 cg Narkophin	10 = 8,0
3^{34}		10 = 7,0
3^{45}		10 = 7,5
3^{49}		10 = 6,5
4^{10}		10 = 7,0
5^{12}		10 = 7,5
5^{40}		10 = 5,0

Versuch 4. 12. XII.
Normal 10 = 7,5.

4^{51}	5 mg Mo	10 = 5,5
5^{36}	3 mg Cocain	
5^{37}		10 = 11,0
5^{59}	5 mg Mo	
6^{01}		10 = 5,5
6^{10}		10 = 5,5
6^{18}		10 = 5,0

Versuch 5. 17. XII.
Normal 10 = 10.

6^{30}	1,62 cg Narkophin (Erregung)	
6^{31}		10 = 11,5
6^{32}		10 = 7,5
6^{35}		10 = 6,5
6^{39}		10 = 5,5
6^{54}		10 = 5,5
6^{57}	3 mg Cocain	
6^{58}	Atmung ganz unregelmäßig	
6^{59}		10 = 13,0
7^{02}		10 = 12,0
7^{04}		10 = 8,0
7^{05}		10 = 7,5

E. Tier Nr. 20. 2200 g.

Versuch 1. 6. XII.
Normal 10 = 12.

5^{01}	5 mg Mo	10 = 7,5
5^{29}		10 = 8,5
5^{30}	5 mg Cocain	
5^{31}		10 = 11,5
5^{36}		10 = 9,0
5^{43}		10 = 10,0
5^{56}		10 = 11,0
6^{01}	5 mg Cocain	
6^{02}—6^{09}		10 = 13,0
6^{10}		10 = 11,0
6^{23}		10 = 9,0

Versuch 2. 10. XII.

6^{01}		10 = 7,0
6^{04}	5 mg Mo	
6^{05}		10 = 7,0
6^{06}—6^{50} (!)		10 = 6,5—7,0
6^{59}	5 mg Cocain	
7^{02}—7^{05}		10 = 13
7^{41}		10 = 6,5

Bemerkung: Einziger Fall der ganzen Reihe, bei dem das Morphin versagte.

Versuch 3. 13. XII.
Normal 10 = 10,5.

11^{56}	5 mg Mo	
11^{59}		10 = 7,5
12^{25}		10 = 7,0
12^{30}	5 mg Cocain	
12^{34}		10 = 28,0
12^{58}		10 = 8,5

Versuch 4. 19. XII.
Normal 10 = 8,5.

12^{09}	1 cg Pantopon	
12^{10}		10 = 7,0
12^{11}		10 = 5,5
12^{44}	5 mg Cocain	
12^{46}		10 = 11,5

Versuch 5. 3. I. 13.
Normal 10 = 7,5.

6^{23}	5 mg Mo	10 = 6,0
6^{27}		10 = 4,5
6^{48}	5 mg Cocain	
6^{49}		10 = 12—13
6^{51}		10 = 10,0
6^{53}		10 = 8,0

F. Tier Nr. 10.

Versuch 1. 3. XII.
Normal 10 = 14.

10^{58}	1 cg Mo	10 = 6,0
11^{36}	5 mg Cocain	10 = 7,7
12^{13}	1 cg Cocain	10 = 10,0

Versuch 2. 7. XII.
Normal 10 = 11.

11^{30}	3,5 cg Narkophin	
11^{32}—11^{35}	starke Erregung	
11^{36}		10 = 7,5
11^{39}		10 = 5,5
11^{57}		10 = 2,75
11^{58}		10 = 2,5
12^{15}	5 mg Cocain	10 = 4,5
12^{58}		10 = 3,75
12^{59}	1 cg Cocain	10 = 7,5
1^{35}		10 = 3,5

Versuch 3. 12. XII.
Normal 10 = 7,0.

12^{14}	1 cg Mo	
12^{16}		10 = 9,0
		10 = 7,0
12^{30}		10 = 6,0
12^{44}		10 = 3,5
12^{56}		10 = 3,5
12^{57}	5 mg Cocain	
12^{58}		10 = 6,0
12^{59}		10 = 7,0
1^{00}		10 = 8,0
1^{18}—1^{30}		10 = 5,5
1^{34}	1 cg Cocain	
1^{35}—1^{37}		10 = 14—15
	(sehr unregelmäß. Atmung)	
1^{38}		10 = 10,5
1^{53}		10 = 9,0
2^{05}		10 = 6,0

G. Tier Nr. 38. 1800 g.

Versuch am 18. II. 12.
Normal 10 = 11 (unregelmäßig.)

11^{57}	0,005 Mo + 0,000 28 Thebain hydr. nach Laudanon I	
11^{57}		10 = 7,5
11^{58}		10 = 6,5
11^{59}		10 = 6,0
12^{33}		10 = 6,0
12^{36}	0,005 Cocain	
12^{37}		10 = 11,5
12^{38}		10 = 12,0
12^{39}		10 = 11,5
12^{42}		10 = 10,0
12^{45}		10 = 10,0
12^{50}		10 = 8,5
12^{52}		10 = 8,0

H. Tier Nr. 60.

Versuch am 18. II. 13.
Normal 10 = 9–9,5.

5^{42}	0,005 Mo + 0,00028 Thebain hydr. nach Laudanon I	
5^{42}		10 = 7,5
5^{43}		10 = 5,5
5^{45}		10 = 6,0
5^{46}		10 = 5,0
6^{06}		10 = 5,0
6^{08}		10 = 4,0
6^{10}		10 = 4,0
6^{13}	5 mg Cocain	
6^{14}	sehr unregelmäßig	
6^{15}		10 = 12,0
6^{16}		10 = 13,5
6^{17}		19 = 11,0
6^{18}		10 = 10,5
6^{20}		10 = 11,0
6^{26}		10 = 8,0

J. Tier Nr. 1. 2200 g.

Versuch 1. 18. XII.
Normal 10 = 9,5.

1^{45}	0,005 Mo	
1^{47}		10 = 9,5
1^{50}		10 = 7,5
2^{08}–2^{13}		10 = 7,5–8,0
2^{14}	0,005 Cocain	
2^{15}	ganz unregelmäßig	
2^{16}		10 = 20,0
2^{17}		10 = 25,0
2^{18}		10 = 25,0

Versuch 2. 24. XII.
Normal 10 = 9,5.

12^{46}	0,005 Mo + 0,00028 Thebain. mur. = 0,00025 Theb. pur. nach Fausts Laudanon I	
12^{48}		10 = 7,5
1^{06}		10 = 7,0
1^{11}		10 = 6,75
1^{20}	5 mg Cocain	
1^{21}		10 = 18,0
1^{22}		10 = 20,0
1^{23}		10 = 23,0
1^{25}		10 = 25,0
1^{42}		10 = 10,0
1^{43}		10 = 10,0

K. Tier Nr. 49. 2100 g.

Versuch 1. 18. XII.
Normal 10 = 10.

6^{11}	5 mg Mo	
6^{13}		10 = 8,5
6^{20}		10 = 7,5
6^{23}		10 = 7,0
6^{24}		10 = 6,75
6^{30}	5 mg Cocain	
6^{41}		10 = 14,0
6^{43}		10 = 14,0
6^{51}		10 = 14,0
6^{58}		10 = 10,0
7^{00}		10 = 10,0

Versuch 2. 27. XII.
Normal 10 = 10.

11^{56}	0,005 Mo + 0,00028 Thebain. hydr. (Roche)	
11^{59}		10 = 9,0
12^{00}		10 = 8,5
12^{20}		10 = 7,0
12^{37}–12^{38}		10 = 6,5
12^{42}	5 mg Cocain	
12^{43}		10 = 9,5
12^{45}		10 = 11,0
12^{47}		10 = 13,0
12^{50}		10 = 12,5
12^{58}		10 — 10,0
1^{11}		10 = 8,0

In den vorstehenden Versuchen hatte die Reizung durch Cocain sich bewährt. Es lag der Wunsch nahe, durch gleichzeitige Injektion der Antagonisten die Atemsenkung zu verhindern. Die folgenden Untersuchungen zeigen, daß sich dies nicht durchführen läßt. Es tritt zuerst eine Verzögerung der Morphinwirkung ein, weil eben Cocain antagonistisch reizt, bald aber klingt die Cocainwirkung ab, und die auch sonst beobachtete Senkung der Atemfrequenz tritt zutage, wie folgende Versuche zeigen:

Versuchsreihe IV.

Tier Nr. 53. 2100 g.

Versuch 1. 16. XII.
Normal 10 = 7,5.

12^{26}	0,005 Mo + 0,005 Cocain
12^{27}	10 = 14,0
12^{28}	10 = 11,0
12^{29}	10 = 10,0
12^{48}	10 = 5,0
12^{50}	10 = 5,5
1^{02}	0,005 Mo + 0,005 Cocain
1^{03}	10 = 12–13
1^{04}	10 = 11,5–12
1^{05}	10 = 11,0
1^{25}	10 = 5,5

Versuch 2. 23. XII.
Normal 10 = 7,5.

6^{45}	0,016 Narkophin + 0,005 Cocain
6^{46}–6^{47}	10 = 15–17
6^{51}	10 = 10,0
7^{02}	10 = 6,5
7^{10}	10 = 5,0
7^{17}	10 = 5,0
7^{20}	10 = 5,5

Versuch 3. 2. I. 13.
Normal 10 = 7,5.

11^{17}	0,01 Pantopon + 0,005 Cocain
11^{18}	10 = 12,0
11^{19}	10 = 11,0
11^{20}	10 = 11,0
11^{21}	10 = 8,0
11^{24}	10 = 7,5
11^{50}	10 = 5,0
11^{58}	10 = 4,0
11^{59}	10 = 4,5
12^{00}	10 = 4,0
12^{03}	10 = 4,0
12^{50}	10 = 5,0
12^{55}	10 = 5,0

III. Versuche mit Kohlensäurereizung.

Straub hat nun angegeben, daß bei einem mit 5 cg Narkotin vorbehandelten Kaninchen das Atemvolumen nach folgender Morphingabe weniger, als bei einem nicht vorbehandelten Tier vermindert wird, sowohl bei Luftatmung als auch besonders bei 10%iger CO_2-Atmosphäre. Die Vorbehandlung hätte zur Folge, daß das Morphin eine geringere Wirkungsintensität auf das Atemzentrum äußert. Derselbe Effekt sei zu erzielen, wenn man äquimolekulare Lösungen von Morphin und Narkotin gleichzeitig injiziere.

Soweit die Luftatmung in Frage kommt, könnte man hiernach ohne weiteres eine Parallele ziehen zwischen Morphin + Narkotin und Morphin + Cocain, wenigstens sofern es die ersten Minuten nach der Injektion betrifft. Man hätte dazu von Cocain nur den 10. Teil (5 mg) der Narkotindosis nötig. Wenn aber Narkotin wirklich ein dauerndes Aufheben der Atemsenkung nach Morphin bewirkt, so wäre das ein wesentlicher Vorteil. Es schien mir daher unerläßlich, mich von der Wirkung des Narkotins in der Straubeschen Versuchsanordnung zu überzeugen. Ich benutzte dieselbe Methodik wie er, nur führte ich die CO_2-Atmosphäre aus einem Spirometer zu, in dem sie vor jedem Versuche frisch gemischt wurde.

Versuchsreihe V.

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
	Versuch 1. Kaninchen 1860 g.		
1′—6′	Normal ohne CO_2	765	10,5
8′—13′	mit „	1903	13,0
36′—41′	ohne „	892	11,0
43′	1 cg Narkotinhydrochlorid intravenös		
45′—48′		913	12,5
50′	2 cg Narkotinhydrochlorid intravenös		
52′—57′		977	13,5
66′—71′		1107	13,0
98′—101′		1105	13,0
	Versuch 2. Kaninchen 1700 g.		
1′—5′	Normal ohne CO_2	516	8,0
18′	5 cg Narkotinhydrochlorid Merck intravenös		
20′—24′	ohne CO_2	1388	14,0
28′—31′		670	8,5
	Versuch 3. Kaninchen 1840 g.		
1′—4′	Normal ohne CO_2	568	7,5
7′—10′	mit „	1728	10,5
65′—67′	ohne „	537	
70′	5 cg Narkotinhydrochlorid intravenös		
73′—78′	ohne CO_2 (größte Erregung)	1403	16,5
88′—91′	ohne CO_2	1140	11,5
130′—33′	(1 Std. post injection.)	823	10,5
	Versuch 4. Kaninchen 1700 g.		
1′—7′	Normal ohne CO_2	363	6,0
9′—15′	„ + „	746	9,5
43′—47′	„ ohne „	418	6,5
49′	5 cg Narkotinhydrochlorid intravenös		
50′—54′ (größte Erregung und Krämpfe)	ohne CO_2	1196	17,0—19,0
60′	5 mg Mo intravenös		
62′—66′	ohne CO_2	480	7,0
68′—72′	+ „	562	8,0
108′—15′	ohne „	363	6,0
118′—25′ (1 Std. nach der Injektion)	+ „	562	7,0

Versuchsreihe V (Fortsetzung).

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
Versuch 5. Kaninchen 1740 g.			
1′—4′	Normal ohne CO_2	510	11,0
6′—9′	+ „	1410	14,0
79′—84′	ohne „	640	9,5
85′	5 mg Mo intravenös		
87′—92′		403	6,5
94′ (Narkotin in dieser Dosis erregt ebenso wie Cocain in entspr. mg)	5 cg Narkotin intravenös		
96′—98′	ohne CO_2	1163	15,0
101′—04′	„ „	599	9,5
115′—17′	„ „	477	6,5
119′—22′	+ „	835	7,5
Versuch 6. Kaninchen 1800 g.			
1′—6′	Normal	519	8,0
7′	1 cg Laudanon I		
8′—13′		362	5,5
15′	4 cg Narkotinhydrochlorid Merck		
17′—22′		639	13,0
Versuch 7. Kaninchen 1700 g.			
1′—6′	Normal ohne CO_2	623	8,0
8′—13′	+ „	1243	10,0
27′—32′	ohne „	533	8,0
34′	5 cg Narkotinhydrochlorid intravenös		
36′—41′		960	14,0
106′—11′ (Narkotinwirkung abgeklungen!)		550	8,0
113′ (Jetzt wirkt Mo wie gewöhnlich.)	5 mg Mo intravenös		
115′—20′		335	5,5

Als erstes Ergebnis aus dieser Zahlenreihe möchte ich hervorheben, daß die Vorbehandlung mit 5 cg Narkotin (Versuch 4) tatsächlich nicht die übliche Senkung des Atemvolumens und der Atemfrequenz nach einer kurz darauf applizierten Morphingabe von 5 mg brachte. Straubs Beobachtung findet also hier eine Bestätigung. Es war aber interessant zu erfahren, aus welchem Grunde die sonst stets erfolgende Atemsenkung nach Morphin hier nicht eintritt. Die Versuche 1 bis 3 geben darüber Auskunft: Narkotin in Dosen von mehreren Zentigrammen übt einen starken und ziemlich andauernden Reiz auf das Atemzentrum aus, der Beschleunigung

der Frequenz und Vergrößerung des Volumens zur Folge hat. In bezug auf das Atemzentrum von Kaninchen kann man deshalb Narkotin ein indifferentes Alkaloid durchaus nicht nennen. Das hat ja schon v. Schröder[1]) in seiner oft zitierten Arbeit klar und eindeutig ausgesprochen, er sagt: „Auf das Respirationszentrum (der Säugetiere) wirkt das Narkotin nicht wie das Morphin herabsetzend und lähmend, sondern erregend.“ Man darf sich daher auch nicht wundern, daß Narkotin in so hohen Dosen die Wirkung von 5 mg Morphin paralysiert. Hier liegt weder eine veränderte Wirkung auf das Atemzentrum vor, noch ein Synergismus von einem wirksamen und einem indifferenten Alkaloid; hier zeigt sich einfach die typische Wirkung von zwei Antagonisten.

Es ist völlig gleichgültig, ob man das Narkotin in solchen Konzentrationen kurze Zeit vor der Morphininjektion oder kurz nachher (Versuch 5 und 6) reicht, immer wird es seine Gegenwart in der eben beschriebenen Weise bekunden. Injiziert man Morphin erst lange Zeit nach dem Narkotin, so ist dessen Wirkung völlig verklungen, und Morphin wirkt jetzt wie gewöhnlich das Atemzentrum lähmend (Versuch 7).

Der Kernpunkt in dieser Frage war für mich: „Wie wirkt eine dem Morphin äquimolekulare Menge Narkotin, wie sie z. B. im Narkophin vorliegt?“ Hebt eine solche auch die Atemsenkung nach Morphin auf oder nicht? Nach Straub tritt bei gleichzeitiger Eingabe von 5 mg Morphin mit einer äquimolekularen Narkotinmenge (= 6 mg) noch kein völliges Verschwinden der Regulation durch das Atemzentrum und ein rasches Wiedererreichen der normalen Regulationsbreite ein; nach meinen Versuchen muß man aber daran festhalten, daß die Zufügung so geringer Mengen von Narkotin die typische Wirkung des Morphins auf die Luftatmung nicht beeinflußt.

Vergleicht man übrigens in der diesbezüglichen Straubschen Arbeit die Skizzen A und C, so sind sowohl beim rein morphinisierten Tier wie bei dem mit Morphin und Narkotin zu gleichen Teilen behandelten die Felder der normalen Luftatmung nahezu gleich; eher ist die Atemvolumenverringerung in A kleiner als in C, da in C nach 5 Stunden die Norm noch nicht erreicht ist. Eine Schonung des Atemzentrums ist hier nicht zu erkennen.

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 17, 109.

Ich lasse jetzt eine größere Anzahl Versuche folgen, die dokumentieren mögen, wie sich Narkophin und Pantopon im Vergleich zum Morphin gegenüber den mit CO_2 gereizten Atemzentrum von Kaninchen verhalten. Die Versuchsanordnung war dieselbe wie bei Tabelle V. Ich habe die Versuche meist nach 1 Stunde abgebrochen, da nach Straubs Erfahrungen das Maximum der narkotischen Wirkung dann erreicht ist und ich auch bei einigen über 3 und 4 Stunden ausgedehnten Versuchen keine übereinstimmenden Beobachtungen nach demselben Präparate wahrnahm.

Versuchsreihe VI.

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
Versuch 1. Kaninchen 1800 g.			
1'—4'	normal ohne CO_2	523	8,5
a) 6'—9'	mit „	1375	12,0
75'—81'	ohne „	650	9,0
b) 84'	5 mg Morphin		
85'—91'	ohne CO_2	407	6,0
114'—17'	„ „	420	6,0
c) 118'—21'	mit „	1010	9,0
144'—47'	ohne „	445	7,0
d) 149'—53' (1 Std. nach der Injektion)	mit „	1039	11,0
Versuch 2. Kaninchen 1650 g.			
1'—4'	normal ohne CO_2	564	10,5
a) 6'—9'	mit „	1190	14,0
18'—22'	ohne „	558	10,0
b) 26'	5 mg Morphin		
27'—31'	ohne CO_2	316	6,5
c) 41'—45'	mit „	722	9,0
77'—81'	ohne „	572	8,0
d) 88'—92' (1 Std. nach der Injektion)	mit „	782	9,5
Versuch 3. Kaninchen 1800 g.			
1'—8'	normal ohne CO_2	600	7,5
a) 9'—16'	mit „	1075	11,5
53'—61'	ohne „	644	7,0
b) 72'—81'	mit „	1389	11,0
c) 98'	5 mg Morphin		
104'—8'	ohne CO_2	394	5,0
d) 109'—13'	mit „	796	6,0
124'—30'	ohne „	720	6,0
e) 131'—37'	mit „	919	6,5
150'—54'	ohne „	662	5,5
f) 155'—60' (1 Std. nach der Injektion)	mit „	930	6,0
172'—77'	ohne „	672	5,5
g) 178'—88'	mit „	983	8,0

Versuchsreihe VI (Fortsetzung).

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
Versuch 4. Kaninchen 1700 g.			
1′—5′	normal ohne CO_2	417	6,0
a) 7′—12′	mit "	993	7,0
41′—46′	ohne "	533	7,5
b) 55′	5 mg Morphin		
59′—66′	ohne CO_2	283	4,5
c) 72′—79′	mit "	576	5,5
103′—09′	ohne "	327	4,5
d) 123′—29′ (1 Std. nach der Injektion)	mit "	597	5,5
Versuch 5[1]).			
1′—6′		490	8,0
a) 7′	5 mg Narkotin hydrochlorid.		
9′—14′		480	8,0
b) 15′	5 mg Morphin		
17′—22′		237	6,0
28′—37′		409	8,0
c) 38′	1,6 cg Narkophin		
40′—49′		167	6,0
62′—71′		365	6,5
d) 73′	1 cg Pantopon		
75′—84′		177	5,0
Versuch 6. Kaninchen 1700 g.			
1′—10′	normal ohne CO_2	647	8,5
a) 12′—21′	$+ CO_2$	1118	10,5
65′—74′	ohne CO_2	717	8,5
b) 76′	6 mg Narkotin-hydrochl.		
78′—82′	ohne CO_2	675	8,5
c) 84′	5 mg Morphin		
86′—90′	ohne CO_2	454	5,5
d) 92′—96′	$+ CO_2$	482	5,5
142′—45′	ohne CO_2	463	5,5
e) 147′—50′ (1 Std. nach der Injektion)	$+ CO_2$	510	6,5
212′—15′	ohne CO_2	424	6,0
f) 219′—23′ (2 Std. nach der Injektion)	$+ CO_2$	872	8,0
288′—90′	ohne CO_2	533	7,0
g) 292′—94′ (3 Std. nach der Injektion)	$+ CO_2$	648	7,0

[1]) Dieser Versuch ohne CO_2-Reizung wurde wegen der Vorbehandlung mit Narkotin hier eingeschaltet.

Versuchsreihe VI (Fortsetzung).

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
Versuch 7. Kaninchen 1750 g.			
1′—6′	normal ohne CO_2	677	8,0
a) 8′—13′	mit „	1377	12,0
22′—25′	ohne „	678	8,0
27′—32′	„ „	578	7,0
b) 37′	1,6 cg Narkophin		
39′—44′	ohne CO_2	395	4,5
53′—57′	„ „	443	4,0
c) 60′—64′	mit „	854	7,5
80′—84′	ohne „	855	6,0
Versuch 8. Kaninchen 1700 g.			
1′—5′	normal ohne CO_2	526	7,5
a) 7′—11′	mit „	1026	9,0
41′—48′	ohne „	583	8,0
b) 51′	1,6 cg Narkophin		
52′—59′	ohne CO_2	414	5,5
109′—13′	„ „	446	5,0
116′—20′ (1 Std. nach der Injektion)	mit „	606	7,0
129′—33′	ohne „	532	6,0
Versuch 9. Kaninchen 1750 g.			
1′—8′	normal ohne CO_2	556	5,5
a) 10′—16′	„ mit „	1150	9,5
39′—45′	„ ohne „	653	6,5
b) 48′—54′	„ mit „	1233	9,5
69′—74′	„ ohne „	762	7,5
c) 79′	1,6 cg Narkophin		
80′—86′	ohne CO_2	247	3,0
d) 87′—93′	mit „	370	4,0
113′—19′	ohne „	445	4,5
e) 120′—27′	mit „	541	4,5
133′—40′	ohne „	463	4,5
f) 142′—49′ (1 Std. nach der Injektion)	mit „	591	4,75
336′—41′	ohne „	462	5,0
g) 342′—47′	mit „	700	6,5
Versuch 10. Kaninchen 1700 g.			
1′—5′	normal ohne CO_2	506	6,0
a) 6′—11′	mit „	1570	10,0
29′—33′	ohne „	578	6,0
b) 34′—39′	mit „	1346	9,5
48′—53′	ohne „	618	6,5
c) 57′	1 cg Pantopon		
58′—63′	ohne CO_2	263	3,5
d) 65′—70′	mit „	400	4,5
93′—98′	ohne „	393	4,5
e) 100′—05′	mit „	515	5,5
117′—21′	ohne „	450	4,5
f) 123′—27′ (1 Std. nach der Injektion)	mit „	670	6,0

Versuchsreihe VI (Fortsetzung).

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Minute im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sek.
	Versuch 11. Kaninchen 1700 g.		
1'—5'	normal ohne CO_2	696	8,0
a) 7'—11'	mit "	1740	11,0
36'—42'	ohne "	654	9,0
b) 43'	1 cg Pantopon		
45'—51'	ohne CO_2	501	5,5
c) 63'—68'	mit "	1310	7,5
98'—103'	ohne "	590	7,5
d) 106'—11' (1 Std. nach der Injektion)	mit "	1365	8,0
167'—69'	ohne "	607	7,5
e) 171'—73'	mit "	1383	8,5
	Versuch 12. Kaninchen 1800 g.		
1'—7'	normal ohne CO_2	454	7,0
a) 10'—16'	mit "	1734	10,0
38'—44'	ohne "	579	7,0
b) 63'	1 cg Laudanon I		
64'—70'	ohne CO_2	463	5,0
c) 73'—79'	mit "	831	7,0
108'—14'	ohne "	419	5,0
d) 115'—21'	mit "	924	6,5
	Versuch 13. Kaninchen 1800 g.		
1'—8'	normal ohne CO_2	440	6,5
a) 10'—17'	" mit "	1491	10,0
30'—36'	ohne "	447	6,5
b) 51'	2 cg Pantopon subcutan		
52'—63'	ohne CO_2	340	5,0
c) 64'—75' subcutan setzt die Atemverlangsamung später ein	mit "	507	5,0
82'—89'	ohne "	214	2,0
d) 93'—100'	mit "	246	2,0
110'—14'	ohne "	188	2,0
e) 119'—23' (1 Std. nach der Injektion)	mit "	286	2,5
	Versuch 14. Kaninchen 1800 g.		
1'—6'	normal ohne CO_2	453	6,0
a) 8'—13'	mit "	1623	9,5
64'—68'	ohne "	520	7,0
b) 74'	3,58 cg Extr. opii (28 %) = 2 g Pantopon subcutan		
75'—84'	ohne CO_2	395	5,6
92'—101'	" "	292	3,0
c) 103'—12'	mit "	491	3,5
112'—17'	ohne "	287	3,0
d) 120'—25' (1 Std. nach der Injektion)	mit "	420	3,0
129'—32'	ohne "	320	2,0

Versuchsreihe VI (Fortsetzung).

Zeit in Minuten	Injektion von	Atemvolumen pro Min. im Durchschnitt ccm	Atemfrequenz pro 10 Sekunden
Versuch 15. Kaninchen 1700 g.			
1'—5'	normal ohne CO_2	505	7,0
a) 7'—12'	mit „	1360	9,5
26'—29'	ohne „	538	6,5
b) 35'	1 cg Morphin		
36'—41'	ohne CO_2	113	1,5
c) 43'—48'	mit „	130	1,5
66'—70'	ohne „	296	2,5
d) 72'—77' (1/2 Std. nach der Injektion)	mit „	418	3,0
93'—100'	ohne „	205	2,5
e) 103'—10' (1 Std. nach der Injektion)	mit „	374	3,0
Versuch 16. Kaninchen 1700 g.			
1'—8'	normal ohne CO_2	536	9,0
a) 10'—17'	mit „ (große Erregung)	2125	14,0
23'—28'	ohne CO_2	577	9,5
b) 33'	2 cg Pantopon		
34'—41'	ohne CO_2	321	3,0
c) 42'—49'	mit „	331	3,0
59'—64'	ohne „	329	2,5
d) 66'—71' (1/2 Std. nach der Injektion)	mit „	404	3,5
Versuch 17. Kaninchen 1750 g.			
1'—6'	normal ohne CO_2	650	7,5
a) 9'—14'	mit „	1544	10,5
47'—54'	ohne „	723	7,5
b) 55'	3,2 cg Narkophin		
60'—69'	ohne CO_2	54	in 1 Min. = 2-3
c) 74'—83'	mit „	84	„ 1 „ = 3-4
118'—21'	ohne „	105	10 Sek. = 1,0
d) 124'—27' (1/2 Std. nach der Injektion)	mit „	88	10 „ = 1,0

In der folgenden Tabelle VII sind die Verminderungen des Atemvolumens und der Atemfrequenz, wie ich sie in den Versuchsreihen I und VI nach 5 mg Morphin, 1 cg Pantopon, 1,6 cg Narkophin, nach 1 cg Morphin, 2 cg Pantopon, 3,2 cg Narkophin und nach Reizungen mit Cocain und Kohlensäure erhielt, in Prozenten berechnet.

Tabelle VIII enthält die Durchschnittswerte der Volumen- und Frequenzabnahme nach 5 mg Morphin, 1 cg Pantopon und 1,6 cg Narkophin aus Tabelle I und VI.

In Tabelle IX ist aus allen meinen Versuchen (Ta-

belle I, III, VI) die **Frequenzabnahme** nach 5 mg Morphin, 1 cg Pantopon und 1,6 cg Narkophin zusammengestellt.

Tabelle VII.

Versuchsreihe	Versuch Nr.	Zugeführt	Ab- oder Zunahme des Volumens %	Ab- oder Zunahme der Frequenz %	Bemerkungen
I	1a)	5 mg Morphin	— 56,4	— 42,0	
	b)	5 „ „	— 76,9	— 33,0	
	c)	5 „ Cocain	+ 147,0	+ 325,0	
I	2a)	5 mg Morphin	— 54,1	— 35,0	
	b)	5 „ „	— 48,7	— 9,0	
	c)	5 „ Cocain	+ 20,3	+ 100,0	
I	3a)	5 mg Morphin	— 75,6	— 38,0	
	b)	5 „ „	— 81,9	— 30,0	
	c)	5 „ Cocain	+ 316,5	+ 140,0	
I	4a)	1,6 cg Narkophin	— 69,8	— 26,6	
	b)	1,6 „ „	— 93,0	— 46,5	
	c)	5 mg Cocain	+ 41,1	+ 88,0	
I	5a)	1,6 cg Narkophin	— 99,7	— 52,5	
	b)	1,6 „ „	— 86,6	— 27,0	
	c)	5 mg Cocain	+ 1100,0!	+ 167,0	
I	6a)	1,6 cg Narkophin	— 44,0	— 37,5	
	b)	5 mg Cocain	+ 130,0	+ 150,0	
	c)	1,6 cg Morphin	— 39,0	— 25,0	
	d)	5 mg Cocain	+ 195,0	+ 300,0	
I	7a)	1,0 cg Pantopon	— 47,8	— 50,0	
	b)	1,0 „ „	— 36,1	— 30,0	
	c)	5 mg Cocain	+ 116,0	+ 189,0	
I	8a)	1,0 cg Pantopon	— 55,1	— 21,0	
	b)	1,0 „ „	— 74,4	— 39,0	
	c)	5 mg Cocain	+ 137,0	+ 118,0	
I	9a)	1,0 cg Pantopon	— 43,0	— 47,0	
	b)	5 mg Cocain	+ 137,0	+ 271,0	
I	10a)	1 cg Laudanon	— 91,0	— 31,5	
	b)	5 mg Cocain	+ 107,0	+ 100,0	
VI	1a)	CO_2	+ 162,0	+ 41,0	
	b)	5 mg Morphin	— 37,4	— 34,0	
	c)	CO_2	+ 141,0	+ 50,0	1/2 Std. n. Injekt.
	d)	„	+ 133,5	+ 57,0	1 „ „ „
VI	2a)	CO_2	+ 111,0	+ 33,0	
	b)	5 mg Morphin	— 43,4	— 33,0	
	c)	CO_2	+ 128,5	+ 38,5	1/4 Std. n. Injekt.
	d)	„	+ 36,7	+ 16,0	1 „ „ „
VI	3a)	CO_2	+ 79,0	+ 53,0	
	b)	„	+ 115,6	+ 57,0	
	c)	5 mg Morphin	— 38,0	— 29,0	

Tabelle VII (Fortsetzung).

Versuchsreihe	Versuch Nr.	Zugeführt	Ab- oder Zunahme des Volumens %	Ab- oder Zunahme der Frequenz %	Bemerkungen
VI	3 d)	CO_2	+ 102,0	+ 20,0	6 Min. n. Injekt.
	e)	„	+ 28,0	+ 8,0	33 „ „ „
	f)	„	+ 41,0	+ 9,0	1 Std. „ „
	g)	„	+ 46,0	+ 45,5	33 „ „ „
VI	4a)	CO_2	+ 138,0	+ 17,0	
	b)	5 mg Morphin	− 47,0	− 40,0	
	c)	CO_2	+ 103,5	+ 22,0	17 Min. n. Injekt.
	d)	„	+ 82,5	+ 22,0	1 Std. „ „
VI	5a)	5 mg Narkotinchlorid	0	0	
	b)	5 „ Morphin	− 51,0	− 25,0	
	c)	1,6 cg Narkophin	− 59,0	− 25,0	
	d)	1 „ Pantopon	− 51,5	− 23,0	
VI	6a)	CO_2	+ 73,0	+ 24,0	
	b)	6 mg Narkotinchlorid	− 6,0	0	
	c)	5 mg Morphin	− 33,0	− 35,0	
	d)	CO_2	+ 6,0	0	8 Min. n. Injekt.
	e)	„	+ 10,0	+ 18,0	1 Std. „ „
	f)	„	+ 106,0	+ 33,0	2 „ „ „
	g)	„	+ 21,5	0	3 „ „ „
VI	7a)	CO_2	+ 103,0	+ 50,0	
	b)	1,6 cg Narkophin	− 31,7	− 35,8	
	c)	CO_2	+ 92,8	+ 87,5	23 Min. n. Injekt.
VI	8a)	CO_2	+ 95,0	+ 20,0	
	b)	1,6 cg Narkophin	− 29,0	− 31,0	
	c)	CO_2	+ 36,0	+ 40,0	1 Std. n. Injekt.
VI	9a)	CO_2	+ 107,0	+ 73,0	
	b)	„	+ 89,0	+ 46,0	
	c)	1,6 cg Narkophin	− 68,0	− 60,0	
	d)	CO_2	+ 49,0	+ 33,0	10 Min. n. Injekt.
	e)	„	+ 21,6	0	40 „ „ „
	f)	„	+ 27,6	+ 5,5	1 Std. „ „
	g)	„	+ 51,5	+ 30,0	4 „ „ „
VI	10a)	CO_2	+ 210,0	+ 66,7	
	b)	„	+ 133,0	+ 58,3	
	c)	1 cg Pantopon	− 47,5	− 47,0	
	d)	CO_2	+ 52,0	+ 28,5	10 Min. n. Injekt.
	e)	„	+ 31,0	+ 22,0	48 „ „ „
	f)	„	+ 49,0	+ 33,0	1 Std. „ „
VI	11a)	CO_2	+ 150,0	+ 37,5	
	b)	1 cg Pantopon	− 23,4	− 39,0	
	c)	CO_2	+ 162,0	+ 36,0	20 Min. n. Injekt.
	d)	„	+ 131,0	+ 7,0	1 Std. „ „
	e)	„	+ 128,0	+ 13,0	2 „ „ „

Tabelle VII (Fortsetzung).

Versuchsreihe	Versuch Nr.	Zugeführt	Ab- oder Zunahme des Volumens %	Ab- oder Zunahme der Frequenz %	Bemerkungen
VI	12a)	CO_2	+ 282,0	+ 43,0	
	b)	1 cg Laudanon	− 20,0	− 28,6	
	c)	CO_2	+ 79,5	+ 40,0	10 Min. n. Injekt.
	d)	"	+ 120,5	+ 30,0	52 " " "
VI	15a)	CO_2	+ 169,0	+ 36,0	
	b)	1 cg Morphin	− 79,0	− 77,0	
	c)	CO_2	+ 15,0	0	8 Min. n. Injekt.
	d)	"	+ 41,0	+ 20,0	37 " " "
	e)	"	+ 82,0	+ 20,0	1 Std. " "
VI	16a)	CO_2	+ 296,0	+ 56,0	
	b)	2 cg Pantopon	− 44,0	− 68,4	
	c)	CO_2	+ 3,0	0	10 Min. n. Injekt.
	d)	"	+ 22,5	+ 40,0	33 " " "
VI	17a)	CO_2	+ 137,0	+ 40,0	
	b)	3,2 cg Narkophin	− 92,5	− 93,0	
	c)	CO_2	+ 55,6	+ 33,3	16 Min. n. Injekt.
	d)	"	− 16,0	0	1/2 Std. " "

Tabelle VIII.

Versuchsreihe	Versuch Nr.	Nach 5 mg Morphin nahm ab Volumen %	Nach 5 mg Morphin nahm ab Frequenz %	Versuchsreihe	Versuch Nr.	Nach 1,6 cg Narkophin nahm ab Volumen %	Nach 1,6 cg Narkophin nahm ab Frequenz %	Versuchsreihe	Versuch Nr.	Nach 1 cg Pantopon nahm ab Volumen %	Nach 1 cg Pantopon nahm ab Frequenz %
I	1a	56,4	42,0	I	4a	69,8	26,6	I	7a	47,8	50,0
	1b	76,9	33,0		4b	93,0	46,5		7b	36,1	30,0
	2a	54,1	35,0		5a	99,7	52,5		8a	55,1	21,0
	2b	48,7	9,0		5b	86,6	27,0		8b	74,4	39,0
	3a	75,6	38,0		6a	44,0	37,5		9a	43,0	47,0
	3b	81,8	30,0		6c	39,0	25,0	VI	5d	51,0	23,0
VI	1b	37,4	34,0	VI	5c	59,0	25,0		10c	47,5	47,0
	2b	43,4	33,0		7b	31,7	35,8		11b	23,4	39,0
	3c	38,0	29,0		8b	29,0	31,0				
	4b	47,0	40,0		9c	68,0	60,0				
	5b	51,0	25,0								
		610,3 : 11	348,0 : 11			619,8 : 10	366,9 : 10			378,3 : 8	296,0 : 8
Mittel		**55,5**	**31,8**	Mittel		**62,0**	**36,7**	Mittel		**47,3**	**37,0**

Tabelle IX.

Vers.-Reihe	Versuch Nr.	Frequenzabnahme nach 5 mg Morphin %	Vers.-Reihe	Versuch Nr.	Frequenzabnahme nach 1,6 cg Narcophin %	Vers.-Reihe	Versuch Nr.	Frequenzabnahme nach 1 cg Pantopon %	Vers.-Reihe	Versuch Nr.	Frequenzabnahme nach 1 cg Laudanon bzw. Morphin+Theb. im entsprechenden Verhältnis %
I	1a	42	I	4a	27	I	7a	50	I	10a	32
	1b	33		4b	47		7b	30	VI	12b	29
	2a	35		5a	53		8a	21	III	G	21
	2b	9		5b	27		8b	39		H	58
	3a	38		6a	38		9a	47		J_2	29
	3b	30		6c	25	VI	5d	23		K_3	35
VI	1b	34	VI	5c	25		10c	47			
	2b	33		7b	36		11b	39			
	3c	29		8b	31	III	A_1	30			
	4b	40		9c	60		A_4	40			
	5b	25		A_2	29		B_2	20			
III	B_1	10		A_3	27		C_4	43			
	B_4	29		B_3	24		D_2	42			
	D_4	27		C_1	19		E_4	35			
	E_1	38		C_2	35						
	E_2	0		C_3	36						
	E_3	33		D_3	38						
	E_5	40		D_5	45						
	J_1	21									
	K_1	33									
		579 : 20 29,0			622 : 18 **34,6**			506 : 14 **36,1**			204 : 6 **34,0**

Tabelle X.

Versuch	1 cg Morphin %	Versuch	3,2 cg Narkophin %	Versuch	2 cg Pantopon %
VI 15b	77	VI 17b	93	VI 16b	68
III F_1	57	III F_2	78		
III F_3	64				
	198 : 3 **66,0**		171 : 2 **85,5**		

1. Diese Tabellen gestatten nur einen Schluß: Die untersuchten Präparate wirken auf das nicht durch CO_2 gereizte Atemzentrum von Kaninchen ihrem Morphingehalt entsprechend gleichartig. Die Frequenz wurde vom Pantopon, Narkophin und Laudanon ungefähr in gleichem Umfange herabgesetzt, das Volumen bei Narkophin mehr als bei Pantopon vermindert (Tab. VIII). Die Reizung des Atemzentrums

mit Cocain und CO_2 ergab so ungleiche Werte, daß diese zur Beurteilung unserer Frage nicht hinzugezogen wurden.

2. In allen Versuchen mit 5 mg Mo oder den entsprechenden Dosen der anderen Präparate konnte 1 Stunde nach der Injektion im Gegensatz zu Straubs Schema stets mit CO_2 noch eine Erregung des Atemzentrums erzielt werden.

3. Die Atemfrequenz bleibt von der CO_2-Reizung nicht, wie A. Loewy[1]) angibt, unberührt; am nicht morphinisierten Tier steigt und fällt sie mit dem Volumen konstant. Am morphinisierten Tier konnte ich noch oft, aber nicht regelmäßig, dieselbe Wahrnehmung machen.

Eine schon öfter diskutierte Frage drängt sich am Schlusse dieser Betrachtungen auf: „Ist die Beeinflussung des Atemzentrums überhaupt durch Morphin als durchaus unerwünscht anzusehen, oder beruht darin gerade ihr oft momentaner Effekt bei Husten und anderen Erkrankungen des respiratorischen Apparats?“ Ein Ausspruch S. A. Fränkels[2]) möge hierauf Antwort geben: „Beruhigung der Atmung stellt eine allgemeine Eigenschaft der pharmakologischen Gruppe des Morphins dar. Wir werden eine solche vor jeder anderen narkotischen Wirkung auftretende günstige Beeinflussung der Atmung bei Tieren von jedem Morphinpräparate verlangen, das als Hustenmittel dienen soll.“

IV. Versuche an Katzen.

Die übereinstimmende Wirkung von Narkophin, Pantopon und Laudanon auf das Atemzentrum veranlaßte mich zu prüfen, ob diese 3 Ersatzpräparate des Morphins auch auf Katzen wie reines Morphin wirkten, oder ob die darin enthaltenen übrigen Alkaloide einen anderen Effekt hervorriefen. Straub hatte gefunden, daß eine Vorbehandlung mit 0,1 salzsaurem Narkotin (subcutan) die nach 1 Stunde ebenfalls subcutan applizierte Wirkung von 0,05 Mo potenziere in dem Sinne, daß die nach Morphin gewöhnlich eintretende Erregung verhindert wird; statt ihrer käme eine rein, wenn auch schwach narkotische Wirkung zustande. Ich habe diesen Versuch wiederholt

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 47, 609.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1899, 11.

und entnehme hierüber folgende Notizen meinem Versuchsprotokoll:

Katze. 2400 g.

1′. 1 dg Narkotinhydrochlorid subcutan.

Tier sitzt dauernd ruhig in der Ecke.

61′. 5 cg Morphin subcutan.

81′. Tier sitzt bis jetzt ruhig.

84′. Auf Anruf schreckt es zusammen. Pupillen sehr weit, reagieren nicht mehr auf Lichteinfall.

91′. Einige unruhige Bewegungen mit dem Kopfe.

91′. Tier steht auf; erste Umdrehung um die eigene Achse.

93′. Geht rückwärts, Unruhe nimmt zu.

95′. Ausgesprochene Morphinwirkung.

98′. Klettert am Käfig hoch. Häufige Drehungen um sich selbst und Rückwärtsbewegungen.

100′. Rennt mit dem Kopf gegen die Wand.

111′. Tobt weiter; es zeigen sich nur kleine Pausen zwischen den Erregungsanfällen.

130′. Dauernd das typische Bild der Morphinkatze.

Nach weiteren 2 Stunden: Immer noch dieselbe Situation; Pausen werden etwas größer.

Nach weiteren 4 Stunden: Zwischen langen Pausen treten immer noch Erregungszustände auf.

Versuch 1a.

Graue Katze. 1500 g.

1′. 0,1 Narkotinhydrochl. subcutan.

65′. Tier saß während einer ganzen Stunde ruhig, ohne besondere Zeichen.

70′. 0,03 Morphin subcutan.

90′. Bis jetzt ruhig.

92′. Plötzlich setzt starkes Toben ein. Tier klettert an der Käfigwand hinauf, rennt dann mit dem Kopf gegen die Scheibe, dreht sich um sich selbst.

95′. Größtes Toben, ausgesprochene Morphinwirkung. Pupillen auf Licht reaktionslos, ganz weit.

107′. Unverändertes starkes Toben, dazwischen einzelne Pausen.

113′. Dasselbe Bild.

149′. Immer unverändert dasselbe Bild, starkes Toben, abwechselnd mit Pausen.

155′. Salivation, sonst wie vorher.

170′. Schwäche scheint das Tier zu befallen.

195′. Tier wird sichtbar schwächer, tobt weniger, kann sich nur schwer noch im Gleichgewicht halten.

240'. Tier liegt am Boden des Käfigs, zitternd, in Schweiß gebadet, vermag sich nicht mehr zu erheben.

270'. Exitus.

Versuch 1b.

Gelbe Katze. 2700 g.

1'. 0,1 Narkotinhydrochl. subcutan.

38'. Tier sitzt dauernd ruhig, ohne irgendwelche auffallende Erscheinungen, miaut nur häufig.

59'. Derselbe Zustand.

62'. 5 cg Morphinhydrochlorid subcutan.

87'. Tier sitzt ruhig, ziemlich apathisch in der Ecke.

91'. Es befindet sich noch immer in der Ecke, schreckt auf Geräusche jetzt zusammen. Pupillen maximal erweitert, reagieren nicht mehr auf Lichteinfall.

101'. Tier wird lebhafter, setzt sich aufrecht, unruhige Kopfbewegungen.

109'. Unruhe; dauernde Bewegung des Kopfes und Rumpfes im Sitzen, Halluzinationen beginnen.

125'. Tier erhebt sich, dreht sich dreimal um sich selbst, kommt aber noch nicht aus der Ecke heraus.

129'. Bewegungsdrang und Unruhe steigern sich.

135'. Ist aus der Ecke herausgekommen, geht rückwärts, dreht sich und tappt unruhig im Käfig herum.

136'. Sehr große Unruhe, Morphinwirkung deutlich.

149'. Häufige Drehungen, schnelle Rückwärtsbewegungen. Aufregung wird immer größer.

159'. Große Erregung, knurrt wütend, versucht an der Käfigwand emporzuklettern, dauernder Bewegungsdrang. Häufige Sprünge.

184'. Größtes Toben unter lautem Schreien, häufiges Emporklettern an der Käfigwand und Stoßen des Kopfes an die Glasscheiben. Darauf kürzere Pausen und dann wieder von neuem größtes Toben und lautes Schreien.

Dieser Zustand wird auch noch 2 Stunden später beobachtet.

Unter 3 Versuchen hatte ich hierbei 2 Versager, aber durch den einen positiv ausgefallenen bestätige ich Straubs Beobachtungen in dem Sinne, daß eine mit 0,1 g Narkotinhydrochlorid vorbehandelte Katze auf 5 cg Morphin nicht nach der gewöhnlichen Zeit (20 bis 30 Minuten) in den Exitationszustand gerät. Es vergeht eine gute Stunde, ehe die Morphinwirkung einsetzt. Dann aber tritt sie ebenso stark zutage wie bei jeder nicht vorbehandelten Katze. Eine Nachbehandlung mit Narkotin ist ohne Erfolg. Auch diese Beobachtung Straubs kann ich bestätigen.

Versuch 7.

Graue Katze. 1600 g.

1'. 0,05 Morphin subcutan.

18'. Tier sitzt bis jetzt dauernd ruhig in der Ecke.

25'. Erste schwache Zeichen von Unruhe.

26'. Maximal weite Pupillen, reagieren nicht mehr auf Lichteinfall.

30'. Plötzliches Einsetzen schwersten Tobens.

47'. Während der letzten 17 Minuten sind dauernd die Symptome einer schweren Morphinvergiftung zu beobachten.

48'. 0,05 Narkotinhydrochlor. subcutan.

50'. 2 Minute; jetzt Sprung zur Decke des Käfigs.

52'. Oft wiederholte Sprünge; größte Erregung.

90'. Es wechselten bis hierher stärkstes Toben mit kurzen Pausen ab.

95'. Beginn der Salivation.

100'. Immer noch stärkstes Toben.

120'. Tier hat sich plötzlich auf den Boden des Käfigs gelegt; kann sich nicht mehr erheben. Äußerst beschleunigte Atmung.

130'. Heftiger Krampfanfall; danach nimmt die Schwäche immer mehr zu.

150'. Liegt sehr geschwächt in einer Ecke.

Nach 4 Stunden Exitus.

Injizierte ich zu gleicher Zeit 5 cg Mo + 5 cg Narkotin, so trat der Erregungszustand ebenso bald und ebenso stark auf wie nach Morphin allein. Folgender Versuch zeigt das deutlich:

Versuch 8.

Schwarze Katze. 1700 g.

1'. 0,05 Morphin + 0,05 Narkotinhydrochlor. gleichzeitig subcutan.

10'. Das bis jetzt ruhig sitzende Tier wird unruhig; ängstliche Bewegungen des Kopfes.

14'. Pupillen sehr weit, reagieren noch auf Lichteinfall. Drehbewegungen des Tieres.

17'. Völlig ausgesprochene Morphinwirkung. Tier springt hoch im Käfig.

18'. Tobt, schlägt mit dem Kopfe an die Glaswand.

20'. Schwerstes Toben.

60'. Bis jetzt wechseln schweres Toben und kurze Pausen ab.

130'. Tier tobt immer weiter.

Nach 2 Stunden noch derselbe Zustand.

Aus diesen Narkotin-Morphin-Versuchen schließe ich, daß eine mit 1 dg Narkotin vorbehandelte Katze auf 5 cg Morphin verspätet reagiert. Käme das Tier überhaupt nicht ins Toben, so würde ich mich ohne weiteres der Meinung anschließen, daß hier eine narkotisierende Wirkung vorläge. Das Tier tobte

aber schließlich ganz außerordentlich stark, und deshalb glaube ich mit gleichem Recht annehmen zu können, daß es sich hier, ebenso wie bei der Wirkung des Narkotins auf das Atemzentrum, um eine dem Morphin antagonistische, d. h. im vorliegenden Falle um eine hemmende Wirkung handelt.

Den letzten Versuch — 5 cg Narkotin + 5 cg Morphin gleichzeitig subcutan appliziert — habe ich mehrmals wiederholt in der Form, wie er für die Praxis wichtig ist, nämlich gepaart mit Meconsäure als Narkophin.

Versuch 2.

Gelbe Katze. 2300 g.

1'. 0,16 Narkophin = 0,05 Morphin subcutan.

9'. Pupillen sehr weit, reagieren noch schwach auf Lichteinfall.

19'. Deutliche Morphinwirkung; Tier äußerst schreckhaft, macht häufig Rückwärts- und Drehbewegungen und Sprünge.

29'. Größte Erregung, tollt im Käfig herum, Pupillen maximal weit und reaktionslos auf Lichteinfall.

79'. Es wechselten kurze Ruhepausen mit großem Toben dauernd ab.

104'. Toben und Ruhepausen folgen immer weiter aufeinander; außerdem tritt jetzt starke Salivation auf.

Nach 2 Stunden noch unveränderter Zustand.

Nach 5 Stunden Exitus.

Versuch 3.

Schwarze Katze. 1500 g.

1'. 0,096 Narkophin subcutan = 0,03 Morphin.

3'. Leckt die Schnauze.

14'. Sitzt noch ruhig.

18'. Fängt an zu erschrecken.

24'. Deutliche Unruhe.

31'. Erste Bewegungen um sich selbst, klettert hoch im Käfig, ausgesprochene Morphinwirkung.

34'. Allerstärkste Morphinwirkung. Tier überschlägt sich 6 mal hintereinander, klettert an die Decke des Käfigs, macht fortwährend ganz unregelmäßige Sprünge und rast ohne Ziel im Käfig herum.

57'. Anfälle noch genau so heftig; sie erfolgen ziemlich rasch aufeinander.

107'. Tier war dauernd heftig aufgeregt; nur kleine Pausen zwischen den Anfällen.

Nach weiteren 2 Stunden immer noch starkes Toben.

Versuch 4.

Graue Katze. 2100 g.

1′. 0,16 g Narkophin subcutan = 0,05 Morphin.

5′. Leckt die Schnauze, erste Zeichen der Unruhe.

11′. Pupillen maximal erweitert, reagiert nicht mehr auf Lichteinfall.

15′. Sehr aufgeregt, springt im Käfig hoch.

16′. Dreht sich um sich selbst, macht Katzenbuckel.

20′. Äußerst schreckhaft, schlägt mit dem Kopfe gegen die Glaswand.

26′. Unaufhörlicher Bewegungsdrang, häufige Sprünge.

33′. Sehr scheu, dauernd unruhig, springt ziellos im Käfig herum.

45′. Häufige Sprünge; schlägt mit dem Kopf an die Glaswand und versucht aus dem Käfig zu klettern.

61′. Die Erregung ist fast ununterbrochen, fast ohne Pause.

80′. Zustand wie bisher.

Nach 2 Stunden ebenfalls noch starke Erregung.

In allen 3 Versuchen, die ich mit Narkophin anstellte, vermochte demnach die hierin enthaltene Menge Narkotin die Morphinwirkung in keiner Weise zu beeinflussen. Ich konnte hierbei weder eine hemmende, noch eine narkotisierende, noch eine potenzierende Wirkung des Narkotins feststellen. Es unterscheidet sich auch in dieser Hinsicht das Narkophin durchaus nicht von dem Pantopon und dem Laudanon I, deren Wirkung auf Katzen ich aus folgenden Beobachtungen erfuhr:

Versuch 5.

Graue Katze. 1300 g.

1′. 0,06 Laudanon I = 0,03 Morphin subcutan.

17′. Tier bisher ruhig, fängt an leicht zu erschrecken. Leises Zittern am ganzen Körper.

20′. Ganz plötzlich setzt jetzt ein heftiger Bewegungstrieb ein. Das Tier rennt 5 mal hintereinander mit dem Kopf gegen die Wand und dreht sich. Pupillen maximal erweitert, reagiert nicht mehr auf Lichteinfall.

22′. Ausgesprochene Morphinwirkung. Tier tobt.

33′. Größere Pausen wechseln mit heftigem Toben ab.

49′. Pausen werden kürzer. Tier tobt weiter.

66′. Derselbe Zustand.

163′. Tier tobt noch immer.

Versuch 6.

Graue Katze. 2100 g.

1′. 0,1 g Pantopon = 0,05 Morphin subcutan.

10′. Tier sitzt noch ruhig, leckt die Schnauze.

16'. Pupillen mäßig erweitert, reagieren noch auf Lichteinfall.

20'. Sitzt noch ruhig in der Ecke.

22'. Sitzt noch immer ruhig; langsames Drehen des Kopfes.

27'. Tier sitzt noch immer ruhig.

29'. Aufregung beginnt; hat scheinbar Halluzinationen; flüchtet sich vor einer Erscheinung.

32'. Springt hoch, dreht sich um die eigene Achse.

38'. Pupillen maximal weit, reagieren nicht mehr auf Lichteinfall.

41'. Tobt heftig.

42'. Liegt ruhig in der Ecke.

43'. Tobt wieder heftig.

60'. Größte Erregung.

Nach 2 Stunden: Heftiges Toben wechselt mit größeren Pausen ab

Nach $4^1/_4$ Stunden: Exitus.

In keinem dieser Versuche konnte ich eine potenzierte narkotische Wirkng des Morphins durch Narkotin beobachten.

V. Darmversuche.

Ein Zyklus weiterer Versuche wurde der Einwirkung der genannten Opiumalkaloide auf den isolierten Kaninchendarm gewidmet. Wenn es auch festgestellt ist, daß der tierische Darm im Vergleich zum menschlichen weit schwächer auf Morphin reagiert, so ist doch eine positive Beeinflussung desselben mit Sicherheit zu erzielen und als Ausgangsmaß für eine eventuelle Änderung durch Zusatz eines zweiten Alkaloids sehr wohl zu benützen. Andere Opiumalkaloide wirken außerdem hierbei viel stärker als Morphin.

Der Darm wurde in Tyrode-Lösung gehangen, Sauerstoff zugeleitet und die Alkaloide vorgewärmt hinzugefügt. Dabei machte ich, wie schon andere vor mir, die Erfahrung, daß man, falls ein Darm in der Norm hohe Exkursionen schreibt, nach Hinzufügung von wirksamen Lösungen oft nur eine Abschwächung wahrnimmt, während dieselben Zusätze völlig tonusaufhebend und vollkommen erschlaffend wirken, wenn die Darmtätigkeit von Anfang an eine geringe war.

Bei Morphin finde ich, etwas anders wie Magnus[1]), etwa 8 cg völlig hinreichend, um deutliche Tonusherabsetzung und fast völlige Erschlaffung zu erzwingen.

---

[1]) Arch. f. d. ges. Physiol. 122, 283.

Äußerst intensiv lähmend wirkt, wie schon von Paals Schüler Popper[1]) beobachtet wurde, das Papaverin.

Kombination von 1 cg Morphin mit 0,0005 Papaverin wirkte nicht anders als das Papaverin allein. (Fig. 1.)

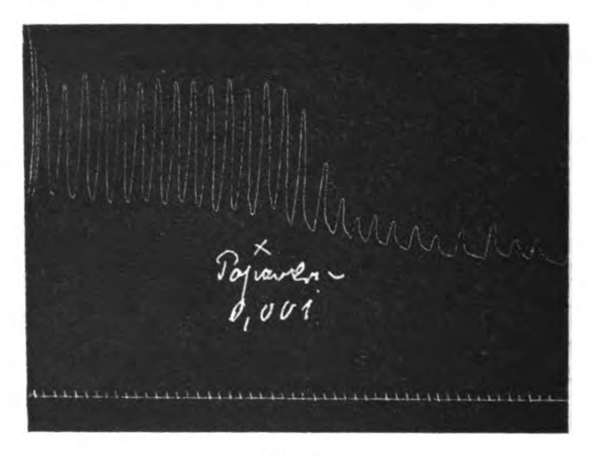


Fig. 1.



Fig. 2.

Codein ist unwirksam.

Narkotin (Fig. 2) ist am isolierten Darm äußerst wirksam; hier kann es Tonusherabsetzung bis zur völligen Erschlaffung bedingen.

---

[1]) Deutsche med. Wochenschr. 1912, Nr. 7.

Narkotin + Morphin ergab reine Narkotinwirkung. Nach 1 mg Narkotin trat mittlere Tonussenkung ein, von der sich der Darm bald wieder erholte. Die Tonussenkung nach 2 mg Narkotin war viel ausgesprochener und hielt viel länger nach. Nach Zusatz von 1 bzw. 2 cg Morphin zeigte sich derselbe Befund ohne jede potenzierte Wirkung. (Fig. 3.)

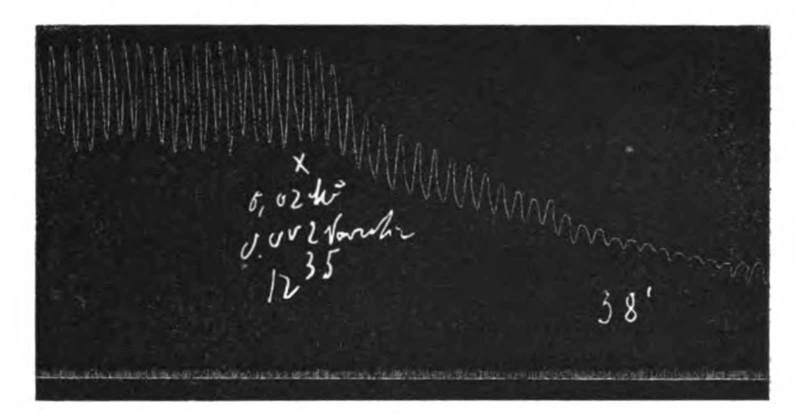


Fig. 3.

Thebain ist ebenfalls nicht indifferent: es wirkte von 2 bis 4 mg an vorübergehend lähmend, tonusherabsetzend.

Morphin + Thebain zeigten auch erst deutliche Beeinflussung

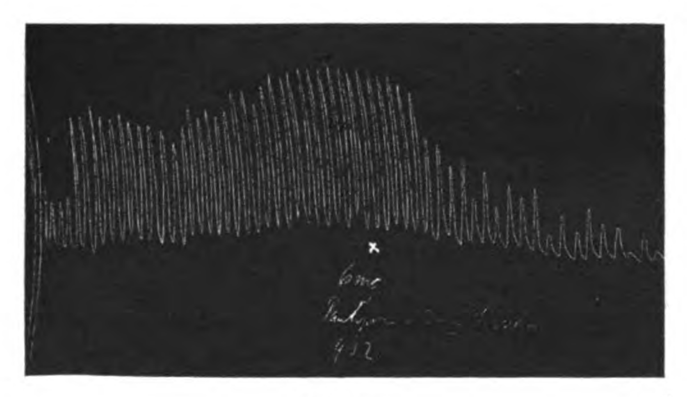


Fig. 4.

des Darmes in Dosen, wo das Thebain allein schon einen sichtbaren muskellähmenden Effekt erzielt.

Pantopon, Narkophin, Laudanon wirkten ebenfalls ihrem Narkotin- bzw. Papaverin-Gehalt entsprechend. (Fig. 4, 5, 6.) Für Pantopon fand ich eine deutliche Wirkung noch bei 5 bis

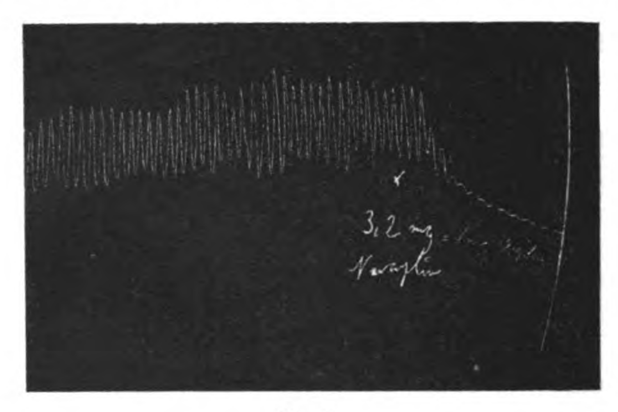


Fig. 5.

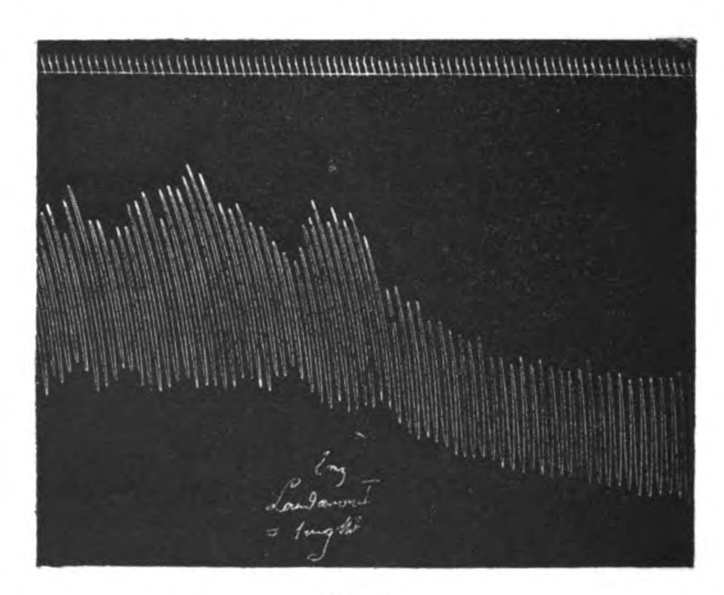


Fig. 6.

6 mg; von Narkophin brauchte ich noch weniger (1 bis 2 mg), um dieselbe zu erzielen. Wie irreführend es aber wäre, aus diesen Kaninchenversuchen ohne weiteres auf die Wirkung am Menschen zu schließen, das lehrt eine soeben erschienene Arbeit

Zehbes[1]). An einer Reihe sehr überzeugender Beispiele (Röntgenuntersuchungen) zeigt der Verfasser, daß Pantopon die Tätigkeit des menschlichen Darmes länger hemmt, als die entsprechende Menge Narkophin. Aus Zehbes Zahlenreihen geht ganz auffallend hervor, daß Narkophin sich in betreff seiner Darmwirkung dem Morphin nähert, während Pantopon hier mit dem Opium in allen wesentlichen Zahlen übereinstimmt.

Zusammenfassend möchte ich sagen, daß, abgesehen von einer größeren Atemvolumensenkung nach Narkophin, weder bei der Wirkung auf das Atemzentrum von Kaninchen, noch beim Narkoseversuch an Katzen, noch bei den Prüfungen am isolierten Kaninchendarm irgendwelche prinzipiellen Unterschiede zwischen Narkophin, Pantopon und Laudanon I festzustellen waren.

Es scheint mir wichtig, mehr die aktiv wirksame Seite des Narkotins in bezug auf Atmung und isolierten Darm, als seine Indifferenz gegenüber dem Großhirn zu betonen.

Die am Eingange dieser Arbeit gestellte Frage, ob aus meinen Untersuchungen eine Potenzierung des Morphins durch das Narkotin hervorgehe, muß ich verneinen; es dürfte aber im Sinne von Zehbes Untersuchungen am Menschendarm weit eher das Pantopon als das Narkophin für die derzeit rationellste Lösung des Opiumproblems angesprochen werden.

---

[1]) Therap. Monatsh. 1913, 406.

Über die Eigenschaft von Kaninchenserum nach der Vorbehandlung mit Emulsin.

Von

Kohshi Ohta (Tokio).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 24. Juli 1913.)

Vor 7 Jahren haben Beitzke und Neuberg[1]) die Beobachtung gemacht, daß das Serum mit Emulsin vorbehandelter Kaninchen die Fähigkeit besitzt, auf ein Gemisch von d-Glucose und d-Galaktose derartig kondensierend zu wirken, daß ein Disaccharid entstand. Da unter dem Einfluß des Serums so vorbehandelter Tiere eine der Emulsinwirkung entgegengesetzte Hemmung sich beobachten ließ, hatten Beitzke und Neuberg die synthetische Funktion einem Antiemulsin zugeschrieben. Seither sind zahlreiche Beobachtungen über ganz besonders ausgeprägte synthetische Wirkungen des Emulsins bekannt geworden. Die grundlegenden Versuche von Rosenthaler[2]) haben gezeigt, daß das Emulsin in zwei Komponenten zerlegbar ist, von denen die eine nur abbauende, die andere lediglich synthetische Fähigkeit besitzt. Und neuerdings haben Bourquelot und Briedel[3]) eine Reihe von Glucosiden mit Hilfe von Emulsin synthetisch dargestellt. Da auch für die anderen auf Kohlenhydrate eingestellten Fermente, namentlich für die dem Emulsin ähnelnde Kefirlactase und für die Maltase, synthetische Leistungen bekannt geworden sind, so haben Beitzke und Neuberg[4])

---

[1]) H. Beitzke und C. Neuberg, Virchows Archiv **183**, 169, 1906.

[2]) L. Rosenthaler, diese Zeitschr. **17**, 257, 1909.

[3]) E. Bourquelot und M. Briedel, Compt. rend. **154**, 1375, 1912; **155**, 523, 1912. — Vgl. J. Hämäläinen, diese Zeitschr. **52**, 409, 1913.

[4]) H. Beitzke und C. Neuberg, Zeitschr. f. Immunitätsforsch. **5**, 645, 1909.

gelegentlich einer Diskussion über die Angaben Cocas[1]) darauf hingewiesen, daß auf Grund der Entdeckung Rosenthalers die Synthese mit Antiemulsin vielleicht nicht auf einen Antikörper, sondern auf im Blut kreisende Emulsinbestandteile zu beziehen sei. Eine ähnliche Anschauung hat jüngst J. Hämäläinen[2]) geäußert. Neuerdings hat Bayliss[3]) die immunisatorische Bildung des Antiemulsins in Frage gestellt; während er eine synthetische Bildung von Lactose unter dem Einfluß von Emulsin aus Glucose und Galaktose zugibt, bezweifelte er die synthetisierende Fähigkeit des Serums der mit Emulsin vorbehandelten Tiere.

Wenn auch die Vorstellung von Bayliss über die Theorie der synthetischen Eigenschaften des Emulsins durch seinen Landsmann E. F. Armstrong[4]) bekämpft wurde, so schien es mir doch wichtig, die experimentelle Grundlage dieser Frage ohne Rücksicht auf alle theoretischen Voraussetzungen einer erneuten Prüfung zu unterziehen, und namentlich zu untersuchen, ob die von Bayliss im Gegensatz zu früheren Autoren vermißte hemmende Wirkung von Emulsinserum auf zugesetztes Emulsin existiert oder nicht vorhanden ist. Im folgenden berichte ich über meine einschlägigen Versuche.

I. Vorbehandlung der Tiere.

Zu den Versuchen benutzte ich vier normale Kaninchen, deren Anfangsgewicht zwischen 2,6 und 3 kg schwankte. Die zur Injektion dienende Emulsinlösung war in folgender Weise bereitet worden: 1 g Emulsin (Kahlbaum) wurde mit 100 ccm Wasser und 1 ccm Toluol unter häufigem Schütteln 24 Stunden bei 37° digeriert. Die durch Filtrierpapier ohne weiteres klar filtrierte Flüssigkeit besaß ein enormes Spaltungsvermögen gegen Amygdalin.

---

[1]) A. F. Coca (Zeitschr. f. Immunitätsforsch. 2, 15, 1909) hatte die irrige Behauptung aufgestellt, daß beim einfachen Erwärmen von Traubenzucker und Galaktose mit essigsaurem Phenylhydrazin Lactosazon entstünde.

[2]) J. Hämäläinen, diese Zeitschr. 52, 409, 1913.

[3]) W. M. Bayliss, Journ. of Physiol. 43, 455, 1912.

[4]) E. F. Armstrong, Die einfachen Zuckerarten und Glucoside, deutsch von E. Unna. Berlin 1913 bei Julius Springer, S. 117 bis 119.

10 ccm dieser Emulsinlösung wurden den Versuchstieren unter völlig sterilen Kautelen subcutan verabfolgt. Mit einem Intervall von 4 Tagen wurden acht Injektionen von frisch bereiteter Emulsinlösung gemacht. Die Tiere vertrugen diese Vorbehandlung ohne Schädigungen. Sie alle nahmen an Gewicht zu, einige sogar beträchtlich. 4 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Entbluten aus der Carotis getötet.

Tabelle I.

	Anfangsgewicht kg	Endgewicht kg	
Kaninchen A	2,926	2,950	lieferte das Immunserum I
" B	2,885	3,400	" " " II
" C	2,580	2,970	" " " III
" D	2,610	2,780	" " " IV

II. Gewinnung von Immun- und Normalserum.

Das Blut der immunisierten Tiere wurde gleich nach der Entblutung durch tüchtiges Schlagen defibriniert und in einem schmalen Meßzylinder mit eingepaßtem Stopfen im Frigo bei — 1° aufbewahrt.

Nach 24 stündigem Stehen hatte sich klares Serum abgeschieden. Eine Behandlung auf der Zentrifuge habe ich absichtlich unterlassen, um jede Schädigung des Serums durch mechanische Einflüsse zu umgehen und um strenge Sterilität aufrechterhalten zu können. Allerdings habe ich auf diese Weise aus 100 bis 150 ccm defibriniertem Blut kaum mehr als 20 bis 40 ccm klares Serum gewonnen.

Das für die vorzunehmende Kontrolle bestimmte Normalserum wurde in gleicher Weise und zu gleicher Zeit (s. unten) von vier gesunden Kaninchen, 2 bis 4 kg schwer, dargestellt.

III. Prüfung der Immunsera auf Hemmungsvermögen.

Die Untersuchung auf antifermentative Wirkung der erwähnten Immunsera wurde in folgender Weise angestellt:

Von der frisch dargestellten 1 %igen Emulsinlösung wurde wegen der enormen Wirksamkeit 0,1 ccm in ein steriles Rea-

gensglas abpipettiert. Dazu wurden aufsteigende Mengen Immunserum bzw. Normalserum, je in einer Quantität von 1 bis 4 ccm, hinzugefügt. Nach Zugabe von genau 10 ccm 2 %iger Amygdalinlösung wurden die Volumina mit physiologischer Kochsalzlösung genau auf 20,1 ccm aufgefüllt, wozu 9 bis 6 ccm Kochsalzlösung notwendig waren. Nach Verschluß mit steriler Watte wurde die Mischung 24 Stunden im Brutschrank bei 37° digeriert. Sämtliche Reagensgläser wurden gleichzeitig aus dem Brutschrank genommen und sofort für 1/4 Stunde in ein siedendes Wasserbad versenkt, um einerseits die Fermentwirkung aufzuheben und andererseits einen Teil des Serumeiweißes auszukoagulieren. Je nach der vorhandenen Menge Serum war die Ausflockung mehr oder weniger deutlich. Der Inhalt der Reagensgläser wurde alsdann quantitativ in einen Meßkolben von 100 ccm übergeführt; durch den Zusatz von 1 bis 3 ccm kolloidaler Eisenhydroxydlösung wurde die völlige Enteiweißung erzielt. Wenn nötig, wurde eine Spur Magnesiumsulfat zur Klärung hinzugesetzt und das Volumen der Flüssigkeit genau auf 100 ccm mit Wasser aufgefüllt. Nach der Filtration durch ein trocknes Filter resultierte ein vollkommen klares Filtrat, in dem der aus Amygdalin abgespaltete Zucker bestimmt wurde. Die Ermittlung der Glucose ist nach der titrimetrischen Methode von Pavy-Kumagawa-Suto vorgenommen, die ebenso bequem wie genau ist.

Außer auf Amygdalin habe ich die Wirkung des Systems Immunserum + Emulsin unter verschiedenen Bedingungen auch auf 2 %iges Salicin studiert. Da Salicin jedoch zu weit geringeren Beträgen hydrolysiert wurde, war schließlich die vorhandene Konzentration von Traubenzucker nur gering, so daß die Zuckerbestimmung hier nicht so genau und eindeutig ausgeführt werden konnte.

Die Kontrollprobe mit Normalserum wurde stets gleichzeitig angesetzt; bemerken möchte ich noch, daß Normaltiere in demselben Zimmer entblutet waren und daß das Serum unter gleichen Bedingungen gewonnen wurde. Postmortale Verschiebungen zwischen beiden Kategorien von Seren sind wohl ausgeschlossen. Die Prüfung gegen Emulsin wurde wie beim Immunserum ausgeführt. Die einzelnen Ergebnisse sind in folgenden Tabellen zusammengestellt:

Tabelle II.

Versuch 1. 24 Stunden bei 37° digeriert.

Versuchs-Nr.	Mischungsverhältnis		Gefundene Glucose in der Gesamtflüssigkeit g	Aus 0,2 g Amygdalin maximal abspaltbare Glucose 0,1405 g. Daher in Freiheit gesetzte Quantität %
1	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0725	51,5
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Immunserum I	1,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	9,0 "		
2	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0532	37,9
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Immunserum I	2,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	8,0 "		
3	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0744	52,8
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Normalserum I	1,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	9,0 "		
4	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0730	51,8
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Normalserum I	2,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	8,0 "		
5 (Kontrolle)	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,1030	73,1
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	physiol. NaCl-Lösung	10,0 "		
	Versuch 2. 24 Stunden bei 37° digeriert.			
6	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0515	36,6
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Immunserum I	4,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	6,0 "		
7	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,1162	82,5
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Normalserum I	4,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	6,0 "		
	Versuch 3. 24 Stunden bei 37° digeriert.			
8	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0618	43,8
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Immunserum II	3,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	7,0 "		
9	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0614	43,5
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Immunserum II	4,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	6,0 "		
10	Amygdalin 2%ig	10,0 ccm	0,0858	61,0
	Emulsin 1%ig	0,1 "		
	Normalserum II	3,0 "		
	physiol. NaCl-Lösung	7,0 "		

Tabelle II (Fortsetzung).

Versuchs-Nr.	Mischungsverhältnis		Gefundene Glucose in der Gesamtflüssigkeit g	Aus 0,2 g Amygdalin maximal abspaltbare Glucose 0,1405 g. Daher in Freiheit gesetzte Quantität %
11	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Normalserum II physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 4,0 " 6,0 "	0,0870	61,8
12 (Kontrolle)	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 10,0 "	0,0980	69,5
	Versuch 4. 24 Stunden bei 37° digeriert.			
13	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Immunserum III physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 2,0 " 8,0 "	0,0466	33,0
14	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Immunserum III physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 4,0 " 6,0 "	0,0454	32,2
15	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Normalserum III physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 2,0 " 8,0 "	0,0870	61,8
16	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Normalserum III physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 4,0 " 6,0 "	0,0814	56,4
	Versuch 5. 24 Stunden bei 37° digeriert.			
17	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Immunserum IV physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 3,0 " 7,0 "	0,0355	25,2
18	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Immunserum IV physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 4,0 " 6,0 "	0,0420	29,8
19	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Normalserum IV physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 3,0 " 7,0 "	0,0667	47,3
20	Amygdalin 2%ig Emulsin 1%ig Normalserum IV physiol. NaCl-Lösung	10,0 ccm 0,1 " 4,0 " 6,0 "	0,0735	52,3

Tabelle III.
Übersichtstabelle.

Versuchs-Nr.	Verwendete Menge		Gefundene Glucose %
1	Immunserum I	1,0 ccm	51,5
3	Normalserum I	1,0 „	52,8
2	Immunserum I	2,0 „	37,9
4	Normalserum I	2,0 „	51,8
5	Kontrolle ohne Serum		73,1
6	Immunserum I	4,0 ccm	36,6
7	Normalserum I	4,0 „	82,5
8	Immunserum II	3,0 ccm	43,8
10	Normalserum II	3,0 „	61,0
9	Immunserum II	4,0 „	43,5
11	Normalserum II	4,0 „	61,8
12	Kontrolle ohne Serum		69,5
13	Immunserum III	2,0 ccm	33,0
15	Normalserum III	2,0 „	61,8
14	Immunserum III	4,0 „	32,2
16	Normalserum III	4,0 „	56,4
17	Immunserum IV	2,0 ccm	25,2
19	Normalserum IV	2,0 „	47,3
18	Immunserum IV	4,0 „	29,8
20	Normalserum IV	4,0 „	52,3

Ein Blick auf die Versuchsprotokolle und auf die Übersichtstabelle zeigt, daß an der hemmenden Wirkung des Immunserums im Vergleich mit Normalserum kein Zweifel bestehen kann. Die hemmende Wirkung scheint sich jedoch erst deutlich zu offenbaren, wenn die absolute Menge von Immunserum nicht so klein ist, wie z. B. in Versuchsnummer 1 und 3. Die Unterschiede zwischen Immun- und Normalserum können 50% übersteigen, wie die Tabellen dartun.

Daß die spaltende Wirkung des Emulsins in rein wässeriger Lösung etwas größer ist als bei der Gegenwart von Normalserum, ist nicht verwunderlich und kann verschiedene Gründe haben. Einmal war jedoch die Hydrolyse in Gegenwart von Normalserum sogar stärker als im rein wässerigen Milieu. In den Versuchen mit Normalserum wurden rund 50 bis 60% der theoretisch möglichen Menge Glucose in Freiheit gesetzt.

Bei den Versuchen mit Immunserum sind dagegen durchschnittlich nur 25 bis 40% der abspaltbaren Zuckermenge gefunden worden. Hervorgehoben sei noch, daß ein Zusatz

von Immunserum über eine bestimmte Menge hinaus keinen erhöhten Einfluß auf die Hemmung zeigt. Dieses Verhalten würde mit einem spezifischen Absättigungsvorgange besser in Einklang stehen als mit einer unspezifischen Hemmung.

IV. Über die synthetische Wirkung des Serums mit Emulsin vorbehandelter Tiere.

Versuch 6.

Je 2,0 g reinste d-Galaktose und d-Glucose wurden in staubfein gepulverter Form in einer kleinen Glasstöpselflasche mit 5 ccm Immunserum III übergossen. Nach Zugabe einiger Tropfen Toluol wurde die Flasche bei 37° in den Brutschrank gestellt. Bei öfterem Umschütteln gingen die Zuckerkrystalle glatt in Lösung. Die Digestion wurde 31 Tage fortgesetzt, wobei zweimal einige Tropfen Toluol nachgegeben wurden. Nach dem Ablauf dieser Frist war das Gemisch absolut steril; es war eine Spur Trübung, aber keine eigentliche Fällung vorhanden.

Zur weiteren Verarbeitung wurde die Mischung mit 100 ccm Wasser in ein Becherglas gespült und mit wenigen Tropfen verdünnter Essigsäure ganz schwach angesäuert. Beim Erwärmen im siedenden Wasserbade fiel das Eiweiß aus, das sich leicht abfiltrieren und auswaschen ließ. Das klare Filtrat wurde mit dem gesamten Waschwasser vereinigt und dann mit 8 g Phenylhydrazin, gelöst in der notwendigen Menge von Essigsäure, $2^1/_2$ Stunden im Wasserbade erhitzt. Vom reichlich ausgeschiedenen Osazon wurde heiß abfiltriert. Beim Erkalten der Mutterlauge entstand in 24 Stunden eine gelbe flockige Fällung, die abgesaugt und dreimal aus siedendem Wasser umkrystallisiert wurde. Sie wog 0,15 g, war hellgelb und krystallinisch und schmolz bei 195° (unkorr.).

Versuch 7.

In einem analogen Versuche wurde ein Gemisch von 5,0 g Glucose und 5,0 g Galaktose plus 35 ccm Immunserum IV angesetzt. Der Versuch wurde ebenfalls auf 1 Monat ausgedehnt. Das durch die Behandlung mit 20 g Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung erhaltene wasserlösliche Osazon wurde

zweimal aus heißem Wasser umkrystallisiert. Zur weiteren Reinigung wurde das Osazon noch einmal unter Zugabe von wenig Tierkohle aus verdünntem Alkohol umkrystallisiert. Die nunmehr ausgeschiedenen Krystalle wurden abgesaugt und im Vakuum getrocknet. Die Ausbeute betrug fast 0,3 g. Der Schmelzpunkt war 194 bis 195° (unkorr.). Die Analyse ergab:

0,1033 g Substanz lieferten 10,0 ccm N (20°, 764 mm).

$C_{24}H_{32}O_9N_4$. Ber. N = 10,73 %; gef. N = 11,12 %.

Da ein Disaccharidosazon 10,7 % und ein Monosaccharidosazon 15,6 % N enthält, so kann kein Zweifel obwalten, daß hier das Phenylosazon eines Disaccharids vorlag. Es muß dahingestellt bleiben, ob die hemmende und synthetische Funktion des Immunserums auf dieselben Bestandteile zurückzuführen ist. Das Emulsin ist nicht einheitlich, sondern ein Gemisch von verschiedenen Enzymen, die nach Einbringung in den Tierkörper ganz verschiedene Wirkung auslösen können. Bezüglich dieses Punktes verweise ich auf eine demnächst erscheinende Mitteilung über diesen Gegenstand.

Über den Abbau der Harnsäure mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz.

Von

Kohshi Ohta (Tokio).

(Aus der chemischen Abteilung des Tierphysiologischen Instituts der Kgl. Landwirtschaftlichen Hochschule zu Berlin.)

(Eingegangen am 24. Juli 1913.)

Das Verhalten der biologisch wichtigen Substanzen zu Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz hat deshalb allgemeineres Interesse erweckt, weil diese Art der Oxydation gewisse Ähnlichkeiten zu den physiologischen Abbauprozessen aufweist; eine formale Analogie besteht auch zu der Wirkungsweise von Agenzien, die zu therapeutischen Zwecken Anwendung finden. So hat C. Neuberg[1]) wiederholt darauf hingewiesen, daß der Effekt der Sonnenstrahlung und des elektrischen Stromes sowie der radioaktiven Substanzen, soweit er in chemisch nachweisbaren Reaktionen besteht, mit der Oxydation durch Hydroperoxyd mannigfache Ähnlichkeiten aufweist.

Neuerdings ist die Frage nach der etwaigen Einwirkung der radioaktiven Substanzen auf die Harnsäure vielfach diskutiert. Aus der Untersuchung von Kerb und Lazarus[2]) einerseits, von Wiechowski und von Knaffl-Lenz[3]) andererseits ergibt sich klar, daß bei den therapeutisch angewendeten

---

[1]) C. Neuberg, Beziehungen des Lebens zum Licht. Monographie. Berlin 1913. — C. Neuberg, Chemische sowie physikalisch-chemische Wirkungen radioaktiver Substanzen und deren Beziehungen zu biologischen Vorgängen. Monographie. Wiesbaden 1913.

[2]) Joh. Kerb und P. Lazarus, Berl. klin. Wochenschr. **1912**, Nr. 12, 14 und diese Zeitschr. **42**, 82, 1912.

[3]) E. v. Knaffl-Lenz und W. Wiechowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. **77**, 303, 1912.

Dosen kein chemischer Abbau der Harnsäure eintritt. Mit ungewöhnlich großen Mengen von Thorium X haben vor kurzem W. Falta und L. Zehner[1]) im Reagensglase bei der Einwirkung auf kleine Mengen harnsauren Natriums eine Zersetzung des Urats beobachtet. Zu diesem Ergebnisse haben C. Neuberg und L. Karczag[2]) bemerkt, daß sich ähnliche Effekte durch Wasserstoffsuperoxyd in Gegenwart einer Spur Eisensalz erzielen lassen, wie aus den Versuchen von Neuberg und Kikkoji[3]) sowie Neuberg und Miura[4]) hervorgeht.

J. Plesch[5]) hat die Ansicht ausgesprochen, daß überhaupt die Ergebnisse von Falta und Zehner dadurch zustande kämen, daß das Thorium X bzw. seine Umwandlungsprodukte in Berührung mit Wasser Wasserstoffsuperoxyd erzeugen, das dann unter Mitwirkung von Spuren mineralischer Katalysatoren die organischen Materialien angreift.

Bei dieser Sachlage schien es mir wichtig, das Verhalten von Harnsäure zu Hydroperoxyd und Eisensalzen einer genaueren Untersuchung zu unterziehen. Über die Einwirkung dieses Oxydationsgemisches auf Harnsäure habe ich keinerlei Angaben in der Literatur gefunden, wohl aber über die Zerlegung von Harnsäure durch Hydroperoxyd in stark alkalischer Lösung, die von M. Scholtz[6]), sowie von A. Schittenhelm und K. Wiener[7]) untersucht worden ist.

Obgleich die Oxydationsbedingungen in stark alkalischer Lösung einerseits und bei neutraler bzw. schwach saurer Reaktion, wie sie das Gemisch von Harnsäure mit Hydroperoxyd und Eisensalz aufweist, andererseits recht verschieden sind, will ich vorweg bemerken, daß die Oxydationsprodukte in beiden Fällen ähnlich sind.

---

[1]) W. Falta und L. Zehner, Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 52.

[2]) C. Neuberg und L. Karczag, Radium in Biologie und Heilkunde 2, 116, 1913.

[3]) C. Neuberg und T. Kikkoji, diese Zeitschr. 20, 523, 526, 531, 1909.

[4]) C. Neuberg und S. Miura, diese Zeitschr. 36, 37, 1911.

[5]) Joh. Plesch, Sitzungen der Charitéges. 1913.

[6]) M. Scholtz, Ber. d. Deutsch. chem. Ges., Jahrg. 34, 4130, 1901.

[7]) A. Schittenhelm und K. Wiener, Zeitschr. f. physiol. Chem. 62, 100, 1909.

Wenn man 1,7 g Harnsäure ($^1/_{100}$ Mol.) mit 105 ccm 3 $^0/_0$igem Wasserstoffsuperoxyd und 0,1 g festem Eisenchlorid auf dem Drahtnetz erhitzt, so gehen die Harnsäurekrystalle bis auf einen minimalen Rest völlig in Lösung. Die heiß filtrierte Flüssigkeit wird auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft und der Rückstand nach dem Erkalten mehrfach mit heißem Alkohol extrahiert. Der Alkohol nahm einen beträchtlichen Teil Eisensalz auf. Zur Entfernung des Restes wurde die in Alkohol unlösliche Substanz in der gerade notwendigen Menge Wasser warm gelöst und tropfenweise Ammoniak bis zur völligen Fällung des Ferrihydroxyds hinzugefügt. Das Filtrat des Ferrihydroxyds lieferte dann nach dem Einengen auf dem Wasserbade einen fast farblosen Krystallbrei, der abgesaugt und nochmals aus heißem Wasser umkrystallisiert wurde. Diese Substanz zeigte alle Merkmale eines Gemisches (N = 33,6 $^0/_0$), so daß zum Versuch einer Aufteilung eine größere Quantität wie folgt dargestellt wurde:

17 g Harnsäure wurden in einem 2-l-Rundkolben aus Jenaglas mit 300 ccm 3 $^0/_0$igen Hydroperoxyds sowie mit 2 g Ferrichlorid versetzt und auf einem Baboblech erhitzt. Zu dem siedenden Gemisch wurde dann aus einem Tropftrichter in kleinen Portionen so lange Wasserstoffsuperoxyd hinzugefügt, bis sämtliche Harnsäure bis auf Spuren gelöst ist[1]). Der Verbrauch an Wasserstoffsuperoxyd betrug in diesem Falle 660 ccm[2]). Die heiß filtrierte Lösung wurde ohne Beseitigung des Eisens 24 Stunden an einem kühlen Orte aufbewahrt. Hierbei schieden sich reichlich Krystalle ab, die abgesaugt und mit kaltem Wasser ausgewaschen wurden. Getrocknet wogen sie 2,2 g[3]); nach zweimaliger Umkrystallisation aus heißem Wasser wurden 1,9 g Substanz erhalten.

Diese Substanz, die als Verbindung A bezeichnet werden soll, zeigte folgende Beschaffenheit. Sie ist schwer löslich im

[1]) Dieselben sind keine Harnsäure, sondern eine anorganische Verunreinigung des käuflichen Präparates.

[2]) Der Verbrauch an 3 $^0/_0$igem Wasserstoffsuperoxyd für die völlige Auflösung von 17 g Harnsäure in der Siedehitze ist nicht immer gleich. Er schwankt zwischen 330 und 660 ccm mit der Schnelligkeit des Erhitzens, der Intensität des Kochens, der Geschwindigkeit des Zutropfens und mit der Feinheit des Harnsäuremehls.

[3]) In anderen Versuchen betrug diese Substanz 1,9 bis 2,2 g.

kalten, etwas leichter im heißen Wasser; in Alkohol und in Äther ist sie unlöslich. Die wässerige Lösung reagiert neutral. Mercurinitrat und Mercuriacetat liefern eine weiße Fällung, die in Essigsäure löslich ist. Beim Kochen mit Kalilauge entwickelt sich Ammoniak. Die Substanz schmilzt ziemlich scharf bei 235° und gibt nach dem Schmelzen Biuretreaktion.

Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl zeigten einen Gehalt von 38,25 % N an. Die Elementaranalyse ergab folgendes: 0,1525 g Substanz lieferten 0,1394 g CO_2 und 0,0590 g H_2O. Daraus folgt 24,94 % C und 4,30 % H.

Diese Eigenschaften stimmen fast vollkommen mit den Literaturangaben für Carbonyldiharnstoff, $C_3H_6N_4O_3$, überein, der 38,35 % N, 24,64 % C und 4,11 % H enthält.

Die von Substanz A abfiltrierte Lösung liefert nach dem Einengen und beim Stehen reichliche Mengen eines Krystallbreies, der zunächst gelbgrün gefärbt ist, beim Waschen mit Alkohol jedoch beinahe farblos wird. Das krystallinische Pulver wurde viermal aus heißem Wasser umkrystallisiert. Es zeigt sich auch dann kein scharfer Schmelzpunkt, sondern eine bei 223° beginnende Zersetzung. Die Substanz ist schwer löslich in kaltem, leicht löslich in heißem Wasser. Die wässerige Lösung reagiert sauer auf Lackmus. Silbernitrat und wenig Ammoniak liefern einen flockigen Niederschlag, der sich nicht beim Erwärmen, wohl aber in Essigsäure löst. Bleiacetat und Bariumchlorid geben keine Fällung, mit Barytwasser entsteht jedoch ein Niederschlag. Mercuriacetat und Mercurinitrat geben eine voluminöse Fällung, die sich auf Zugabe von Essigsäure löst. Millons Reagens erzeugt ebenfalls einen weißen Niederschlag. Beim Erwärmen mit Kalilauge entweicht Ammoniak. Der Körper gibt nach dem Schmelzen keine Biuretreaktion. Die Menge dieser Substanz, die bei verschiedenen analogen Versuchen erhalten wurde, betrug 2,0 bis 4,1 g. Die Substanz macht einen einheitlichen Eindruck und die vielfach ausgeführten Analysen haben fast übereinstimmende Zahlen gegeben. Ob die Verbindung Tetracarbonimid oder ein anderes Oxydationsprodukt der Harnsäure enthält, kann ich nicht mit Sicherheit sagen. Den Stickstoffgehalt fand ich zu 29,19 bis 29,26 %, den C- und N-Gehalt ein wenig schwankend.

Mit Leichtigkeit gelang es, drei weitere Spaltungsprodukte

der Harnsäure zu erkennen, nämlich Harnstoff, Oxalsäure und Ammoniak.

Zur quantitativen Ermittlung des Harnstoffes wurde das Filtrat von der abgeschiedenen Substanz A zur Trockne abgedampft und mit heißem Alkohol ausgezogen. Der alkoholische Auszug wurde eingeengt und wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen. Durch mehrfache Wiederholung dieser Prozedur blieb fast alles Eisen bei den alkoholunlöslichen Stoffen. Der schließlich in Alkohol vollständig lösliche Rückstand wurde so lange mit Äther versetzt, bis eine opake Trübung eintrat. Die nach mehrtägigem Stehen klar gewordene Flüssigkeit wurde vom Bodensatz abfiltriert, durch Abdampfen von Äther und Alkohol befreit und nach dem Lösen in wenig Wasser mit konzentrierter starker Salpetersäure (1,4 D) so lange versetzt, als ein dichter Niederschlag auftrat. Derselbe wurde in einem Goochetiegel abgesaugt, mit Salpetersäure nachgewaschen und im Vakuumexsiccator zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Substanz war typischer salpetersaurer Harnstoff. Es wurden davon in einem Versuch mit 17 g Harnsäure 4,337 g, entsprechend 2,12 g Harnstoff, isoliert. In einem anderen Falle konnten 3,710 g Nitrat, entsprechend 1,81 g Harnstoff, abgeschieden werden.

Im alkoholischen Auszug, der zur eben beschriebenen Darstellung des salpetersauren Harnstoffes diente, ließ sich Oxalsäure nachweisen, wenn man den in Wasser aufgenommenen, schwach sauer reagierenden Abdampfrückstand mit Natriumacetat und Essigsäure versetzte und etwas Calciumchlorid zugab. Es schied sich typisches Calciumoxalat ab, jedoch in kleiner Menge.

Zur Bestimmung des Ammoniaks, das bei der Oxydation von Harnsäure mit Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz entsteht, bin ich in der folgenden einfachen Weise vorgegangen:

In der mehrfach beschriebenen Art wurden a) 1,7 g Harnsäure in Gegenwart von 0,2 g Eisenchlorid mit Wasserstoffsuperoxyd in der Siedehitze behandelt. Zur Lösung waren in verschiedenen Ansätzen 42 bis 45 ccm 3 %igen Hydroperoxyds notwendig. Das Reaktionsprodukt reagierte deutlich sauer, so daß ein Entweichen von Ammoniak nicht zu befürchten ist. Die gesamte Flüssigkeitsmenge wurde alsdann in einem

Schlösingschen Apparat übergespült und mit 10 g Magnesia versetzt, die mit Wasser zuvor zu einer Milch angerührt war. In den Säurebehälter wurden 25 ccm $^n/_{10}$-H_2SO_4 gegossen und mit Kongolösung versetzt. Am nächsten Tage war bereits Farbenumschlag erfolgt.

Deshalb wurden im Versuch b) und c) nur 0,85 g Harnsäure in Gegenwart von 0,1 g Eisenchlorid mit 23 ccm Wasserstoffsuperoxyd in Lösung gebracht. Die Behandlung im Schlösingschen Apparat geschah genau wie im Versuch a) unter Vorlage von 25 ccm $^n/_{10}$-Schwefelsäure. Nach 5 Tagen wurde die nicht verbrauchte Säuremenge zurücktitriert. Durch Magnesia waren im Mittel 0,0306 g Stickstoff in Form von Ammoniak in Freiheit gesetzt, entsprechend ca. 11 $^0/_0$ des vorhandenen Gesamtstickstoffs. Es muß dahingestellt bleiben, ob die im Schlösingschen Apparat ausgetriebene Menge Ammoniak aus Ammonsalzen oder anderen leicht Ammoniak entwickelnden Verbindungen stammt.

Die Oxydation der Harnsäure mit Hydroperoxyd und Eisensalz verläuft der Oxydation in alkalischer Lösung zwar ähnlich, doch nicht analog. Schittenhelm und Wiener isolierten bei alkalischer Oxydation Carbonyldiharnstoff, Harnstoff und Oxalsäure, daneben auch Tetracarbonimid, das ich bei dem von mir angewendeten Oxydationsverfahren nicht nachweisen konnte. Die Menge des Carbonyldiharnstoffes, die 11,2 bis 13,0 $^0/_0$ betrug, war bei mir etwas größer, als sie Schittenhelm und Wiener angeben. Über die Menge des Harnstoffes und über eine Bildung von Ammoniak machen die Autoren keinerlei Angaben.

Die mitgeteilten Versuche zeigen, daß Hydroperoxyd und Eisensalz die Harnsäure vollständig in wasserlösliche Produkte überführen. Diese quantitative Zerstörung der Harnsäure habe ich bei Siedetemperatur bewirken können. Es erschien mir von Interesse festzustellen, ob Wasserstoffsuperoxyd und Eisensalz auch bei Körpertemperatur die Harnsäure angreifen. Zu diesem Zwecke habe ich eine Reihe verschiedener Proben angesetzt. Stets wurden 1,7 g Harnsäure mit 70 ccm Wasserstoffsuperoxyd übergossen und hierzu 0,2 g Ferrichlorid oder Ferrisulfat gegeben. Beim Stehen im Brutschrank war das Wasserstoffsuperoxyd in 24 Stunden verbraucht. Es wurden dann noch weitere 70 ccm

Wasserstoffsuperoxyd hinzugegeben, die ebenfalls beim Stehen verbraucht wurden. Nach 5 Tagen wurde der Bodensatz abfiltriert und ein paarmal mit kaltem Wasser nachgewaschen. Im gelbgrünen Filtrat wurde der Stickstoff in üblicher Weise nach Kjeldahl bestimmt. Ich fand in 4 verschiedenen Versuchen: 0,0591 g N, 0,0725 g N, 0,0770 g N und 0,0798 g löslichen N.

1,7 g Harnsäure enthalten 0,56 g N. Demnach wurden in meinen Versuchen 10,6 % bzw. 13,0 % resp. 13,8 % oder 14,2 % des Harnsäurestickstoffs bei der Digestion im Brutschrank in lösliche Stickstoffverbindungen übergeführt. Es kann kaum zweifelhaft sein, daß bei besserer Berührung der Oxydationsmittel mit der Harnsäure, etwa durch Schütteln, ein größerer Anteil von Harnsäure umgesetzt worden wäre.

Über die Resorptionsgeschwindigkeit der Eiweiße und ihrer Abbauprodukte im Dünndarm.

Von

Hermann Messerli.

(Aus dem Physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 15. Juli 1913.)

Einleitung.

Die Ansichten über die Art und Weise, in der das aufgenommene Eiweiß vom Darm resorbiert wird, sind trotz aller Fortschritte unserer Kenntnisse und der darauf gewandten Arbeit noch recht geteilt. Die wesentlichen Punkte sind in aller Kürze die folgenden.

Bei der natürlichen Aufnahme von Eiweiß fragt es sich, ob nur tiefe Eiweißabbauprodukte oder höhere, dem Eiweiß sehr nahe stehende Abbauprodukte, und tiefere oder schließlich neben den Abbauprodukten auch Eiweiß als solches mit resorbiert werden. Bei der experimentellen Zufuhr der verschiedenen Arten von Eiweißabbauprodukten handelt es sich um die verschieden beantwortete Frage, ob die tiefsten Abbauprodukte am schnellsten oder ob höhere Abbauprodukte nicht ebenso schnell und ev. schneller resorbiert werden. Die Methodik und die Gesichtspunkte, von denen ausgehend man an die Beantwortung dieser Fragen herangetreten ist, sind gleichfalls sehr verschieden gewesen. Asher und seine Mitarbeiter Kusmine, Böhm, Reichenau, Pletnew und Loeb haben gelegentlich ihrer Untersuchungen zur Funktion der Leber mehrfach die Frage der Resorption von Eiweiß und Eiweißabbauprodukten gestreift. Dabei fanden sie eine Reihe von Tatsachen, die übereinstimmend am einfachsten sich durch die Annahme erklärten, daß höhere Abbauprodukte des Eiweißes, nämlich Albumosen und Peptone, als solche resorbiert werden und ihre eigentümlichen Wirkungen in der Leber entfalten. Sie kamen somit zu einem ähnlichen Ergebnis wie auf einem ganz andern Wege Nolf.

Gerade weil der Modus, in dem die Eiweißresorption vonstatten geht, nicht allein für sich Interesse hat, sondern von hoher Bedeutung

für unsere Vorstellungen über die Funktion der Leber und über den Anteil, den die übrigen Körperzellen an der Synthese und Verarbeitung des Eiweißes besitzen, ist, scheint es geraten, noch auf dem vielbetretenen Wege der direkten Prüfung der Resorption im Darme erneut Aufschluß zu suchen. Deshalb habe ich auf Rat und unter Beihilfe von Professor Asher die Resorption von Eiweiß und seinen Abbauprodukten, höhern und tiefern, im Darme vergleichend untersucht,

Wenn Methoden von hinreichender quantitativer Genauigkeit zur Verfügung ständen, erschien es trotz mannigfacher anscheinend gegenteiliger Befunde in der reichlichen Literatur unseres Gegenstandes aussichtsreich, den Anschluß an die oben erwähnten, mit Hilfe indirekter Methoden gefundenen, dabei aber auf sehr sicherer Basis ruhenden Tatsachen zu gewinnen. Da bei meinen Versuchen rein die Resorption mit Ausschluß jeder Mitwirkung der Verdauung untersucht werden sollte, kamen die neueren von Pawlow, Cohnheim und London mit so viel Erfolg benutzten Methoden der Dauerfisteln nicht in Betracht, da deren Stärke ja gerade darin liegt, möglichst viele der unter normalen Bedingungen einwirkenden Faktoren gemeinsam zur Geltung kommen zu lassen. Die Vellafistel eignete sich für meine Zwecke besser. Erstens kann dieselbe leicht so gründlich ausgespült werden, daß quanitativ das im Darm Zurückbleibende wiedergewonnen werden kann. Zweitens lassen sich in einer Vellafistel die Verdauungsprozesse auf ein Minimum einschränken. Drittens läßt sich leichter als bei anderen Methoden experimentell die Geschwindigkeit des Durchlaufens der zu resorbierenden Lösungen variieren. Gegenüber der vielgeübten Methode, die Resorption im akuten Versuch an abgebundenen Darmschlingen zu untersuchen, hat die Vellafistel vor allem den Vorzug, daß mannigfache operative Störungen und Hemmungen fortfallen, und daß an einem und demselben Tiere die Resorption vergleichend unter den verschiedensten Bedingungen geprüft werden kann.

Methodik der Versuche.

Als Versuchstier diente ein Hund, der zur Anlegung einer Thiry-Vellafistel als geeignet erschien. Es war ein noch in der Wachstumsperiode befindlicher, 8 Monate alter, mittelgroßer, männlicher Foxterrier von 13,5 kg Gewicht.

Die Operation geschah am 16. XI. 1912 nach der Methode Kochers unter strengster Beobachtung aller Regeln sorgfältigster Asepsis. 50 cm Darm dicht unterhalb dem Duodenum dienten zur Herstellung der Fistel. Die Wunde heilte p. primam, und schon am 7. Tage nach der Operation ließ sich die Fistel bequem und ohne alle Schwierigkeiten katheterisieren und mit physiologischer Kochsalzlösung durchspülen.

Zur Ausführung der Versuche gewöhnte sich das Tier bald so weit, daß es sich willig auf die linke Seite legen ließ und in dieser Situation jeweilen stundenlang ruhig verharrte. Dieser Liegelage, die für den Hund angenehmer und für die gegebenen Verhältnisse zweckmäßiger erschien als die Schwebehaltung im Cyonschen Gestell, wurden denn auch die übrigen technischen Einrichtungen angepaßt. Ich ließ mir zwei konisch zulaufende, ziemlich weitlumige, 10 cm lange Glasröhrchen herstellen und bekleidete sie mit entsprechend langen Stücken gewöhnlichen Gummischlauchs. Diese steifen Katheter ließen sich ohne Mühe nebeneinander in die beiden Fistellumina einführen, und, da sie konisch zuliefen, kam es zu einem völligen Verschluß der beiden Öffnungen. Außerdem schloß sich die Darmwand infolge des guten Tonus ihrer Muscularis immer eng an die Röhrchen an. Auf diese Weise war ich sicher, quantitativ genau zu arbeiten, d. h. daß alle Flüssigkeit, die im Sinne der Peristaltik durch den einen Katheter in das obere duodenale Ende der Fistel eingeführt wurde, wirklich auch die Darmschlinge passierte und zum anderen unteren Katheter wieder herauskam und aufgefangen werden konnte. Als Sammelgefäß dazu diente eine gewöhnliche nierenförmige Schale, deren konvexer Rand sich dicht an die Bauchseite des Versuchstieres anschmiegen ließ.

Eine weitere wichtige Bedingung für das gute Gelingen der Versuche war, daß die Lösungen immer körperwarm und unter mäßigem Druck eingeführt wurden. Diesen Erfordernissen genügte folgender einfach konstruierte Apparat: In einem 1000 ccm fassenden, unten durch einen Kork wasserdicht abgeschlossenen Glasmantel staken zwei durch Löcher in dem Kork herausgeführte Büretten, die eine von 100 ccm, die andere von 50 ccm Inhalt. Im Verlauf der beiden von den Büretten wegführenden Gummischläuche war ein Dreiwegehahn eingeschaltet, von dem aus ein zuführender Schlauch in den Einführungskatheter überging. Der ganze Apparat wurde durch ein Stativ etwas erhöht über dem Untersuchungstisch gehalten.

Nach zahlreichen Vorversuchen schien nun folgende Versuchsanordnung als die gegebene:

Zu Beginn eines jeden Versuchs füllte ich die Bürette à 100 ccm mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung und die andere Bürette à 50 ccm mit der zu untersuchenden auf 38° erwärmten Nährlösung und brachte in den Glasmantel heißes Wasser, wodurch die beiden Lösungen in den Büretten bis zu Ende des Versuchs warm gehalten wurden. Zuerst wurde die Fistel mit Kochsalzlösung in raschem Strome mehrmals gründlich durchgespült, um den Darm von Schleim und Sekret

und allfälligen Verunreinigungen zu entleeren. Dann wurde durch entsprechende Stellung des Dreiwegehahns die Nährlösung ganz langsam fließen gelassen, bis 50 ccm davon eingeführt waren. In diesem Moment wurde der Hahn sofort wieder für den Kochsalzstrom geöffnet, der, rasch durchfließend, die Resorption unterbrach und alle an der Darmschleimhaut haftende Nährlösung samt Schleim und Sekret herausbeförderte. In quantitativen Voruntersuchungen habe ich ermittelt, daß 200 ccm Kochsalzlösung für diese Durchspülung, die nie länger als 2 Minuten dauerte, vollauf genügten. Sämtliche aus dem Ausführungskatheter fließende Lösung, sowohl die Nähr- wie die Kochsalzlösung, wurde in der Sammelschale [aufgefangen und, verdünnt mit der Ausspülflüssigkeit der Schale selbst, in einem Meßzylinder gemessen. Gewöhnlich waren es Quantitäten von 500 ccm. Diese wurden nun filtriert und je 50 ccm davon einer Doppelanalyse nach Kjeldahl unterworfen. Die Differenz der aus dem Mittel zweier oder dreier gut stimmenden Titrationen berechneten N-Mengen der eingeführten und ausgeführten Lösungen entspricht dem resorbierten Anteil des eingeführten N. Die Resorptionsdauer, die durchschnittlich 30 bis 40 Minuten betrug, wurde notiert vom Moment an, wo die Nährlösung in der Bürette zu fließen begann bis zur Unterbrechung der Resorption durch den Kochsalzstrom am Ende des Versuchs.

Der Hund befand sich im allgemeinen immer wohl und litt in keinerlei Weise unter den oft täglich an ihm vorgenommenen Versuchen. Seine physiologische Entwicklungsperiode wurde keineswegs ungünstig beeinflußt, wie schon aus dem Verhalten seines Gewichts hervorgeht, das innerhalb der Zeit von 3 Monaten um 3 kg zunahm. Dasselbe wurde nicht regelmäßig notiert, doch sind folgende Angaben zu machen: 16. XII. 1912 = 13,5 kg; 10. XII. = 15,0 kg; 1. I. 1913 = 16,25 kg; 25. I. = 15,75 kg; 8. II. = 16,3 kg; 28. II. = 16,5 kg.

Es scheint zweckmäßig, noch über die Herstellung der Nährlösungen im Zusammenhang zu berichten. Dieselben wurden bei den leichtlöslichen Präparaten wie Pepton, Erepton[1]), reinen Aminosäuren und Traubenzucker unter leichtem Erwärmen in 0,9 %iger Kochsalzlösung hergestellt, bei den übrigen wie Casein, hydrolysiertes Casein, Gliadin und Hämoglobin in 0,9 %iger Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,2 % Soda.

Hier folgen nun die Versuchsprotokolle in möglichst chronologischer Reihenfolge, indem die zu vergleichenden Resultate in Tabellen zusammengestellt werden.

---

[1]) Das Erepton entstammte der Sendung, die Herr Professor Abderhalden seinerzeit gütigst für die von A. Loeb ausgeführte Arbeit zur Verfügung gestellt hatte. Das hydrolysierte Casein sowie die Aminosäuren verdanken wir der Liberalität der Firma Hoffmann, La Roche & Co. in Basel. (L. A.)

Tabelle I.

Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen Pepton — hydr. Casein und Erepton. Versuche vom 5. bis 9. und 16. bis 19. XII. 1912.

		a	b	c	d	e	f	g	h
		Eingeführt			Ausgeführt				
Datum 1912	Lösung	Menge der eingeführten Lösg. ccm	N-Gehalt mg	Resorptionsdauer Min.	Nicht resorbierter N mg	Resorbierter N mg	Resorbierter N %	Resorpt. in 10 Min. mg	Mittlere Resorpt. in 10 Min. mg
5. XII.	I. Hydr. Casein	50	117,247	40	39,216	78,031	66,51	19,50	22,08
6.	II. Hydr. Casein	50	117,247	24	59,381	57,866	49,26	24,11	
9.	III. Hydr. Casein	50	117,247	30	49,365	67,882	57,80	22,63	
16. XII.	I. Erepton	50	193,581	35	96,156	97,425	50,33	27,84	27,46
16.	II. Erepton	50	193,581	38	86,463	107,118	55,24	28,19	
18.	III. Erepton	50	193,581	40	88,178	105,403	54,46	26,35	
18. XII.	I. Pepton	50	252,715	40	149,612	103,103	40,79	25,78	26,60
19.	II. Pepton	50	252,715	45	127,663	125,052	49,50	27,79	
19.	III. Pepton	50	192,064	42	81,851	110,213	57,47	26,24	

Diese Versuche sowie die in der Zeit vom 10. bis 14. XII. 1912 mit Casein und Serum ausgeführten, die im Anschluß an Tabelle II besprochen werden, sind besonders instruktiv und hervorhebenswert, weil so hohe Resorptionswerte für die betreffenden Eiweißstoffe und Abbauprodukte später nicht mehr erreicht wurden, als auch, weil die Resultate der einzelnen zusammengehörigen, aus Perioden von verschiedener Dauer auf die gleiche Zeit von 10 Minuten berechneten Versuche recht genau miteinander übereinstimmen. Damit hat sich eine Befürchtung, die von vornherein zu etwelchen Bedenken Anlaß geben mußte, nicht erfüllt, nämlich die, daß schon für dieselbe Nährlösung sich recht verschiedene Resorptionswerte herausstellen könnten, was natürlich eine vergleichende Besprechung der Resultate in bezug auf die Resorptionsgeschwindigkeit verschiedener Eiweiße einerseits als auch höherer und tieferer Spaltprodukte andererseits ungleich erschwert, ja vielleicht vereitelt hätte. Es war ja an die Möglichkeit zu denken, daß die Fistelschleimhaut, in ihrem Resorptionsvermögen von irgendwelchen inkonstanten und unberechenbaren Faktoren beeinflußt, bald besser,

bald schlechter resorbieren könnte. Das scheint jedoch nach den vorliegenden Versuchen nicht der Fall zu sein. Im Gegenteil, es zeigt sich die überraschende Tatsache, daß, wenn man, wie es in Kolumne g geschehen ist, die Resorptionswerte in 10 Minuten berechnet, sich kaum voneinander differierende Zahlen ergeben. Bei hydr. Casein, das an verschiedenen Tagen geprüft worden ist, sind die Unterschiede etwas größer als bei Erepton und Pepton, von welchen Präparaten jeweilen zwei Versuche an einem Tage kurz nacheinander ausgeführt wurden.

Obschon sich in der ausgeführten Lösung weder von Pepton noch Erepton und hydr. Casein eine erhebliche Schleimbeimengung vorfand, wurde doch nicht unterlassen, eine quantitative Prüfung auf allfälliges, während des Versuchs und namentlich bei der Kochsalzdurchspülung der Darmschleimhaut entzogenes Eiweiß zu machen. Zu diesem Zwecke wurde bei Versuch 1′ mit hydr. Casein vom 5. XII. der filtrierten ausgeführten Lösung eine Probe von 100 ccm entnommen und in der Siedehitze nach Zusatz einiger Tropfen verdünnter Essigsäure zu fällen versucht. Doch ergab sich nur eine ganz leichte, kaum merkliche Trübung, die auf verschwindend wenig Eiweiß schließen ließ. In der Tat zeigte die nach der Fällung und Filtration vorgenommene Kjeldahl-Bestimmung der enteiweißten Lösung kein Minus, sondern sogar ein kleines Plus gegenüber der bei Versuch 1 ausgeführten Menge nicht resorbierten N: nämlich 39,40 mg gegen 39,216 mg N. Aus dieser und anderen zur Kontrolle angestellten Eiweißfällungen, die immer zum selben Ergebnis führten, durfte folglich für meine Resultate geschlossen werden, daß eine diesbezügliche Korrektur an ihnen nicht vorzunehmen war. Daher schien es erlaubt, diese kaum bedeutsame Fehlerquelle, die bei den Versuchen mit genuinen Eiweißen sowieso mit in Kauf zu nehmen war, auch bei den Versuchen mit Abbauprodukten unberücksichtigt zu lassen.

Was nun bei näherer Betrachtung der Tabelle I vor allem auffällt und zuerst zu besprechen ist, sind die in Kolumne f angeführten Werte, die das Verhältnis des resorbierten zum eingeführten N in Prozenten ausdrücken. Diese Zahlen schwanken fast durchwegs zwischen 50 und 60%, und es ergibt sich somit aus ihnen für alle Produkte eine recht bemerkenswerte mittlere Resorptionsgröße. Da sie im übrigen von der Kon-

zentration der eingeführten Lösungen abhängig sind und zu dieser in umgekehrtem Verhältnis stehen, geht es natürlich, da letztere bei hydr. Casein und Erepton etwas geringer gewählt worden ist als bei Pepton, nicht an, sie miteinander zu vergleichen. Doch läßt sich ganz im allgemeinen aus ihnen ersehen, daß bei diesen ersten Versuchen das Resorptionsvermögen der Darmschleimhaut ein maximales war.

Wenn man die von Zunz[1]) in seinen sehr gründlichen Untersuchungen für Witte-Pepton zu 50,0%, für Albumose B^{III} Pick zu 45,3% und für abiurete Produkte zu 34,0% angegebenen mittleren Verhältniswerte des resorbierten zum eingeführten N vergleichend heranzieht, so ergibt sich, daß sie im allgemeinen niedriger sind als die in der Tabelle I registrierten Zahlen, obschon die Resorptionsdauer in den Zunzschen Versuchen 1 Stunde betrug. Diese Wahrnehmung, daß die in meinen Versuchen gefundenen relativen und absoluten Resorptionswerte für alle Produkte im allgemeinen größer sind als die der Literatur entnommenen Angaben, muß später bei den mit Serum erhaltenen Resultaten noch mehr auffallen. Es ist vielleicht hier der Ort, zur Erklärung dieser Beobachtung darauf hinzuweisen, daß bei der Thiry-Vellafistel verschiedene, die physiologische Funktion der Darmschleimhaut sicher ungünstig beeinflussende Faktoren ausgeschaltet sind, wie sie dem akuten Verfahren nun einmal anhaften und dort nicht vermieden werden können: so die Shokwirkung bei der Operation, die Narkose und die sonstigen mechanischen wie nervösen Schädigungen des in situ isolierten Darmes.

Um zum Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeit einen absoluten Maßstab zu haben, sind in Kolumne g die 10-Minuten-Resorptionswerte zusammengestellt. Vergleichen wir zunächst Pepton und Erepton, so ergibt sich ein kleines Plus von 0,86 mg N zugunsten von Erepton, eine Differenz, die, wenn man die verschiedenen möglichen Fehlerquellen berücksichtigt, wie sie bei solchen Versuchen und quantitativen Massenbestimmungen nicht zu umgehen sind, wohl kaum in Betracht zu ziehen ist, so daß also nach meinen Versuchen Pepton und

[1]) Edgar Zunz, Contribution à l'étude de la digestion des albumoses dans l'estomac et dans l'intestin grêle. Arch. internat. de pharmacodynamie et de thérapie 15, 3 u. 4.

Erepton in ihrer Resorptionsgeschwindigkeit einander gleichzusetzen sind. Anders verhält es sich mit hydrolysiertem Casein, das am langsamsten von den drei untersuchten Produkten resorbiert wird und das, wie in der Tabelle II zu zeigen sein wird, den mit Blutserum gefundenen Werten auffallend nahesteht. Worin der Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen hydrolysiertem Casein und Erepton als zwei total gespaltenen Produkten beruht, ist nicht ohne weiteres erklärlich. Auch in der Literatur finden sich einander widersprechende Mitteilungen: während Nolf[1]) und Honoré bei ihren Versuchen mit abiureten Produkten eine ganz schlechte Resorption fanden und eine auf intensive Reizung der Darmschleimhaut zurückzuführende beträchtliche Volumenzunahme der Darmschlinge konstatierten, wird von London und Abderhalden[2]) angegeben, daß in den Dünndarm von Hunden eingeführtes Erepton innerhalb 3 Stunden zu 77 bis 83%, resorbiert werde.

Wie dem auch sei, jedenfalls geht aus meinen erhaltenen Zahlen, die für sich selbst sprechen, mit Bestimmtheit hervor, daß hydrolysiertes Casein bedeutend schlechter resorbiert wird als Pepton, während sich Erepton diesem letzteren gegenüber ungefähr gleich verhält. Diese Ergebnisse stimmen, was hydrolysiertes Casein und Pepton betrifft, im wesentlichen überein mit der Konstatierung von Nolf[3]), der angibt, daß abiurete Produkte, verglichen mit Witte-Pepton, schlecht, d. h. nur im Verhältnis 37 : 50 resorbiert werden. Zum selben Resultat gelangt schließlich auch Zunz[4]), wenn er schreibt: „Si l'on considère le coefficient intestinal absolu d'absorption azotée, c'est à dire, si l'on calcule la quantité d'azote absorbée par kilogramme-heure en grammes et non en pour-cent de l'azote introduit, on voit que, pour la même teneur approximative en azote, ce coefficient correspond à une valeur moyenne comprise entre 20 et 25 centigrammes d'azote tant pour les protéoses provenant de la pep-

---

[1]) P. Nolf, Les albumoses et peptones sont-elles absorbées par l'épithélium intestinal? Journ. de physiol. et de pathol. générale 1907, 925 bis 938.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 251.

[3]) P. Nolf, l. c.

[4]) Edgar Zunz, Contribution de l'étude de la digestion et de la résorption dans l'estomac et dans l'intestin grêle chez le chien. 1908.

tone de Witte que pour cette dernière elle-même, alors que cette valeur n'est jamais atteinte avec la solution de produits abiurétiques isolés de la peptone de Witte." — Während nun aber Nolf aus dieser von ihm festgestellten Tatsache, daß höhere Spaltprodukte rascher resorbiert werden als tiefere, die sich daraus notwendigerweise ergebenden Folgerungen zieht und zu einer ganz anderen, einfacheren Auffassung vom Wesen des Abbaus der Eiweißstoffe und ihrer Resorption gelangt wie Abderhalden, kommt Zunz unter Berücksichtigung all der Erscheinungen, wie sie sich bei der Resorption im Darm abspielen, am Ende doch wieder dazu, mit Abderhalden anzunehmen, daß alles Eiweiß bis zu den niedersten Bausteinen aufgespalten und daraus indifferentes Bluteiweiß synthetisiert werde. Zunz macht nämlich geltend, daß vor der Resorption des Peptons und höherer Abbauprodukte wie Albumosen eine partielle Umwandlung derselben in tieferstehende Stufen durch das Erepsin des Darmsaftes stattfinde, und daß sich daher nicht entscheiden lasse, wieviel N in Form höherer und wieviel als tiefere Spaltprodukte resorbiert werde. Er hat auch diesbezügliche Versuche mit der Albumose B^{III} Pick gemacht und fand 1 Stunde nach ihrer Einführung in den Dünndarm in der Tat eine beträchtliche Menge N in Form weiter gespaltener Produkte vor, sowie auch den Eiweißsubstanzen näher als die Albumose B^{III} Pick stehende Körper, die er sich nur durch chemische Synthese infolge reversibler Wirkung der Darmsaftfermente erklären kann. Die Gesamtheit all dieser bei der Resorption beobachteten Erscheinungen läßt Zunz nicht entscheiden, ob die höheren Spaltprodukte rascher resorbiert werden als die tieferen.

Nicht so Nolf, der den Einwand einer eiweißspaltenden Umwandlung höherer Spaltprodukte durch das Erepsin des Darmsaftes nicht zuläßt und ihn widerlegt, indem er zeigte, daß die raschere Resorptionsgeschwindigkeit der ersten Stufen sich bestätigt sowohl bei Tieren, in deren Darmschlinge Trypsin Zutritt hatte, als auch bei solchen, wo das nicht der Fall war. Damit ist bewiesen, daß die Resorption von der fermentativen Einwirkung der Verdauungssäfte innerhalb gewisser Grenzen unabhängig ist, und der Nachweis erbracht, daß höhere Spaltprodukte wie Albumosen und Peptone direkt als solche durch

die Darmschleimhaut resorbiert werden. Das zugestanden, so liegt nun nichts näher als der logische Schluß, daß auch physiologischerweise im Darm des Tieres dieselben Vorgänge der Resorption stattfinden wie im Experiment. Dann aber folgert aus den vorliegenden Resultaten mit zwingender Notwendigkeit, daß nicht alles Eiweiß in der Darmschleimhaut bis zu den letzten Bausteinen aufgespalten zu werden braucht, um resorbiert zu werden, sondern daß eine ergiebige Menge von Nahrungsstickstoff schon in Form höherer Stufen wie Albumosen und Peptone resorbiert wird.

Für diese von Nolf mit viel Geschick vertretene Auffassung lassen sich ganz gut die Befunde von London, Abderhalden, Zunz und andern Autoren verwerten, die auf sichere Weise festgestellt haben, daß im Anfang der Dünndarmverdauung die ersten Stufen der Eiweißspaltung vorwiegend sind. Daß diese im weitern Verlauf der Verdauung dann immer mehr und mehr aus dem Darm verschwinden, läßt sich ebensogut mit der Auffassung von Nolf vereinbaren, daß sie als solche direkt resorbiert werden, wie mit der Ansicht von Kutscher, Abderhalden, Zunz und andern, daß sie durch fermentative Prozesse bis zu den niedersten Stufen weiter gespalten werden.

Nach alledem scheint die Lehre von der obligaten totalen Aufspaltung des Eiweißes kaum mehr haltbar zu sein. Läßt sich doch nicht verstehen, warum die Spaltung der Eiweiße bis zu den letzten Stufen vor sich gehen soll, während nachgewiesenermaßen das Dünndarmepithel für die höhern Spaltprodukte durchlässiger ist. Zum mindesten müßte das als ein völlig nutzloser Vorgang erscheinen. Ja, Nolf steht nicht an, das Auftreten einer mehr oder weniger großen Menge von krystalloiden Produkten im Dünndarm als für den Organismus schädlich zu bezeichnen, was er aus der intensiven Reizwirkung dieser Produkte auf die Darmschleimhaut schließen zu dürfen glaubt. Wenn sich in meinen Versuchen mit hydrolysiertem Casein und Erepton keine besonders auffallende Schleimsekretion bemerken ließ, so mag das nur an der geringen Konzentration der eingeführten Lösungen liegen. Und wenn sich auch für Pepton und Erepton nahezu die gleichen absoluten Resorptionswerte ergaben, um so entschiedener sprechen die für hydrolysiertes Casein im Vergleich zu Pepton erhaltenen Resultate für die

Nolfsche Lehre, daß höhere Spaltprodukte rascher resorbiert werden können, eine Tatsache, die durch viele direkte Beweise gestützt wird, während für die entgegengesetzte Annahme keine absolute zwingende Beweistatsache vorliegt. Man wird vielleicht gegen diese Argumentation einwenden, daß es mehreren Forschern gelungen ist, ausschließlich aus tiefsten Abbauprodukten Eiweißsynthese zu erzielen. Unbestreitbar ist der Nachweis dieser Art Eiweißsynthese erbracht. Wer aber die näheren Umstände kennt, unter denen dieser Nachweis erbracht worden ist, weiß, daß es sich um gelungene Ausnahmefälle handelt. Dieselben belehren, in wie weiten Grenzen sich die Leistungen des Organismus bewegen, es wäre aber unbiologisch, in den Ausnahmefällen die Regel zu erblicken.

Eine zu erörternde Frage ist nun noch die, was dann weiter mit diesen höheren Spaltprodukten nach ihrer Resorption geschieht: Werden sie in der Darmschleimhaut direkt zu Eiweiß synthetisiert oder gelangen sie in der Leber zur weiteren Verarbeitung?

Darüber liegt nun eine große Anzahl von Barbèra und in neuester Zeit von Asher und seinen Mitarbeitern Kusmine, Böhm[1]), Pletnew[2]) und Loeb[3]) angestellter, sehr bemerkenswerter Versuche vor, die sämtlich in unzweideutiger Weise zeigen, daß nach der Einführung von Pepton sich die Intensität der Stoffwechselvorgänge in der Leber steigert, was sich namentlich, wie Loeb[3]) am Gallenfistelhund dargetan hat, an einer vermehrten Gallenproduktion sehr schön zeigen und messen läßt.

In dieser ganzen Kette von zum Teil schon entschiedenen Fragen, die das Schicksal der Eiweiße, ihre Spaltung, Resorption und Synthese im Organismus betreffen, bleibt dann noch ein wichtiges Problem zu lösen übrig, nämlich das, ob und welche Eiweißabbauprodukte im Zustand der Verdauung beim Hund im Pfortaderblut gefunden werden. Diese

---

[1]) Zeitschr. f. Biol. 51.

[2]) Diese Zeitschr. 21.

[3]) Adam Loeb, Über den Eiweißstoffwechsel des Hundes und über die Ausscheidung der Galle bei Fütterung mit Eiweiß und Eiweißabbauprodukten, mit besonderer Berücksichtigung der zeitlichen Verhältnisse. Zeitschr. f. Biol. 55.

Frage ist, weil schon recht verschieden beantwortet, noch unentschieden und harrt ihrer Lösung durch zukünftige Untersuchungen. Nach jüngsten Mitteilungen scheint der Nachweis von Spaltungsprodukten des Eiweißes im Blute unter normalen Bedingungen auch mit Hilfe der chemischen Methode zu gelingen.

Tabelle II.

Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen Casein und Serum. Versuche vom 10. bis 14. XII. 1912.

		a	b	c	d	e	f	g	h
		Eingeführt			Ausgeführt				
Datum 1912	Lösung	Menge der eingeführten Lösg. ccm	N-Gehalt mg	Resorptionsdauer Min.	Nicht resorbierter N mg	Resorbierter N mg	Resorbierter N %	Resorpt. in 10 Min. mg	Mittlere Resorpt. in 10 Min. mg
10. XII.	I. Casein	50	119,672	46	62,308	57,364	47,84	12,47	12,73
11.	II. Casein	50	119,672	30	80,687	38,985	32,57	12,99	
12. XII.	I. Serum	50	335,184	30	274,537	60,647	18,08	20,21	20,17
14.	II. Serum	50	335,184	40	252,296	82,888	24,75	20,72	
14.	III. Serum	50	335,184	34	268,576	66,608	19,88	19,59	

Aus einem Vergleich dieser für Casein und Serum erhaltenen Resultate mit den in Tabelle I registrierten Zahlen ergibt sich zunächst gar kein großer Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen genuinen Eiweißen und tief gespaltenen Abbauprodukten, was namentlich daraus hervorgeht, daß sich für Serum fast so hohe Resorptionswerte ergaben wie für hydrolysiertes Casein. Dieselben sind nur um 1,91 mg niedriger, woraus folgt, daß diese eine entgegengesetzte Stellung einnehmenden Substanzen Serum und hydrolysiertes Casein, von denen die eine am Anfang und die andere am Ende einer langen Reihe von Spaltprodukten steht, nicht, wie man meinen sollte, recht ungleich rasch resorbiert werden, sondern sich auffallend nahestehen. Und doch sind die Blutserum-Eiweißkörper nicht diejenigen Eiweißkörper, die am leichtesten löslich sind und am raschesten resorbiert werden. Auch für Casein resultiert eine immerhin beträchtliche Resorptionsgröße, obschon sich gegenüber Serum ein ziemlich großer Abstand ergibt.

Rascher als Casein wird das Pflanzeneiweiß Gliadin,

schlechter als beide wieder Hämoglobin resorbiert. Es wird das hier nur der Vollständigkeit wegen mitgeteilt, ohne daß die betreffenden Versuche zum Vergleich in die Tabelle II aufgenommen worden sind, weil sie in einer spätern Periode ausgeführt wurden, zu einer Zeit, wo das Resorptionsvermögen der Fistel nicht mehr gleich gut war.

Die von frühern Autoren für Serumeiweiß mitgeteilten relativen Resorptionswerte stehen, obschon sie höher angegeben werden, mit meinen Zahlen, aus denen sich eine durchschnittliche Resorption von 20,9% des eingeführten N ergibt, in keinem Verhältnis, wenn man die ungleich längere Resorptionsdauer bei ihren Versuchen in Betracht zieht. So fanden Bauer und Voit[1]) für Blutserumeiweiß eine Resorption von 22 bis 32% in 4 Stunden, Heidenhain[2]) gibt eine solche von 13 bis 31% der org. Substanz an und Friedländer[3]) von im Mittel 21% in 4 Stunden.

Obschon diese Angaben mit meinen Zahlen ziemlich genau übereinstimmen, lassen sie sich doch nicht ohne weiteres mit ihnen vergleichen, weil die Resorptionszeit in meinen Versuchen nur 30 bis 40 Minuten betrug. Vielleicht erklärt sich dieses Mißverhältnis einfach dadurch, daß, wie Zunz später beobachtet hat, beim akuten Verfahren die Resorption in der ersten Stunde des Versuchs viel bedeutender ist als im weitern Verlauf einer mehrstündigen Resorptionsdauer, da parallel das Resorptionsvermögen der Darmschleimhaut mehr und mehr abnimmt.

Was nun Casein betrifft, so fand Friedländer, der die in Wasser unlöslichen Eiweißstoffe, wie Globulin und Casein, prüfte, für dieses letztere trotz mehrmals wiederholter Versuche keine Resorption. Eine Erklärung für diesen negativen Befund sah er darin, daß sich bei Eröffnung des Darms die Schleimhaut von weißen Membranen belegt zeigte, indem sich das Casein in Form von Klümpchen und Häuten dicht an dieselbe angeschlossen hatte, nachdem alles Lösungsmittel während des 4 Stunden langen Versuchs vorher resorbiert worden war. Doch können dieses rasche Verschwinden des Lösungsmittels sowie die Schwerlöslichkeit des Caseins selbst keineswegs die eigentlichen ursächlichen Momente sein, denn sonst bliebe in

---

1) Zeitschr. f. Biol. 5, 564, 1869.
2) Arch. f. d. ges. Physiol. 56, 570, 1894.
3) Zeitschr. f. Biol. 33, 264, 1896.

den Friedländerschen Versuchen unerklärt, warum das ebenfalls schwerlösliche Serumalbumin relativ so gut resorbiert wurde. Und wenn Friedländer zum Schlusse kommt, daß Casein, um resorbiert zu werden, einer vorherigen Umwandlung in leichter lösliche Eiweißstoffe, wie Albumosen und Peptone, bedürfe, die auch bei sehr eingedickter Lösung gelöst bleiben und resorbiert werden, so sprechen meine Versuche gegen dieses Postulat. Denn eine solche Umwandlung durch das Erepsin des Darmsaftes ist aus schon angeführten Gründen nicht anzunehmen und wäre wohl auch kaum möglich in der vor und nach dem Versuch gründlich gereinigten Fistel. Somit ist auch für Casein, ganz gleich wie es für die andern Eiweißstoffe bewiesen ist, festgestellt, daß es in unveränderter Form direkt als solches resorbiert wird, eine Tatsache, die ihm in der Reihe der Eiweißstoffe nicht eine Sonderstellung einräumt, sondern es auf gleiche Stufe setzt wie die andern geprüften Substanzen. Daß Casein als solches resorbiert werden kann, zeigen auch die Versuche von Brücke, der nach Aufnahme von Milch in den Chylusgefäßen fällbares Casein vorfand.

Es muß demnach dieser von Friedländer beobachteten Resorptionsunfähigkeit des Caseins eine andere Ursache zugrunde liegen und nach einer andern Erklärung dafür gesucht werden. Weil auch in meinen Versuchen Casein später nicht mehr resorbiert wurde, wird auf diesen Punkt noch einmal zurückzukommen sein bei Besprechung der betreffenden negativen Resultate.

Um einmal zu zeigen, welche Bedeutung diesen für Serum und Casein erhaltenen Resorptionswerten eigentlich zukommt, will ich hier für Casein folgendes Rechenexempel ausführen: Wenn die 10-Minuten-Resorption für dasselbe zu 12,5 mg N angenommen wird, so macht das eine Stunden-Resorption von 75 mg N und eine Tages-Resorption von $24 \times 75 = 1800$ mg N aus, abgesehen davon, daß das Resorptionsvermögen der Darmschleimhaut mit der Zeit der Inanspruchnahme allmählich sinkt, ein Faktor, mit dem natürlich in praxi zu rechnen sein würde. Diese Tages-Resorption von 1800 mg N entspricht, wenn man den N-Gehalt der Eiweißstoffe zu 15% annimmt, 12 g Eiweiß, was als eine im Verhältnis zu der 50 cm messenden Darmschlinge des Versuchstieres recht bedeutende Tages-Resorptions-

größe erscheinen muß. Nun gibt Frank die Dünndarmlänge eines mittelgroßen Hundes zu 4 m an, so daß sich also für den ganzen Dünndarm in 24 Stunden eine Resorption ausrechnen ließe von $8 \times 12 = 96$ g Eiweiß, eine Tagesmenge, die natürlich für den Hund weit über dem Eiweißminimum steht, und womit das Tier sich nicht nur auf seinem Bestand erhalten, sondern noch N retinieren kann. Diese rein theoretische Rechnung soll nur dartun, daß das Resorptionsvermögen der normal funktionierenden Darmschleimhaut auch für genuine Eiweiße, und in diesem speziellen Falle für eines, das verhältnismäßig nicht rasch resorbiert wird, ein sehr bedeutendes ist.

Nachdem durch die bisherigen Versuche die Hauptfragen der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen genuinen Eiweißen einerseits und ihren verschieden weit gespaltenen Abbauprodukten andererseits in befriedigender Weise gelöst waren, schien es erlaubt, der Frage näher zu treten, in welcher Weise eine eiweißfreie resp. eine eiweißreiche Ernährung des Versuchstieres die Resorption beeinflussen. Diese Frage war um so interessanter, weil bisher noch keine solchen Versuche vorlagen und theoretisch verschiedene Möglichkeiten der Beantwortung gegeben waren. Denn erstens konnte man sich vorstellen, daß durch eine während mehreren Tagen fortgesetzte Fütterung mit eiweißfreier Kost der Organismus des Tieres in einen Zustand des Eiweißhungers versetzt würde, was sich darin äußern müßte, daß die Darmzellen nach Einführung von Eiweißnährlösungen N begieriger, intensiver und rascher resorbierten, um bei nachheriger eiweißreicher Diät wieder zur Norm zurückzukehren. Aber auch das gerade Gegenteil ließ sich denken: Eine weniger rasche, trägere Resorption, weil das Darmepithel durch den mehrtägigen Eiweißmangel vor allem in seiner normalen Funktion beeinträchtigt werden könnte, was physiologisch ebenso verständlich ist, wie die Gier und der Hunger nach N. In diesem Falle müßten sich die Darmzellen bei eiweißreicher Fütterung wieder erholen. Eine dritte Möglichkeit endlich war die, daß sich gar kein erheblicher Unterschied in der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen den beiden Ernährungsarten ergeben könnte, vielleicht weil die für das Tier getroffenen Perioden mit eiweißfreiem Futter zu kurz waren, um den Organismus nach der einen oder andern Richtung hin zu beeinflussen.

Der Hund wurde in zwei 14tägigen Versuchsperioden abwechslungsweise je 7 Tage mit eiweißfreien und hernach 7 Tage mit eiweißreicher Nahrung gefüttert. Als eiweißfreie, d. h. eiweißarme Kost diente ein Futter, das sich zu gleichen Teilen zusammensetzte aus Schweineschmalz, Reisstärke und Zucker. Nachdem Schmalz für sich vorgekocht worden war, wurde die vorher in Wasser unter Erwärmen aufgelöste Stärke zugefügt und ebenfalls gekocht, bis das ganze zu einem bläulichen Stärkekleister eingedickt war. Diese mit Zucker versüßte und mit Fleischsauce schmackhaft gemachte Nahrung wurde vom Hund nach anfänglichem Widerwillen ganz gern gefressen und auch gut vertragen, so daß entsprechend der Freßlust des Tieres die Tagesmengen der einzelnen Komponenten in der zweiten Versuchsserie von 75 auf 100 g erhöht werden konnten. Als eiweißreiche Nahrung wurde gekochtes, ganz mageres und sehnenfreies Pferdefleisch gegeben in Tagesportionen von 400 bis 500 g.

Tabelle III.

Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen eiweißarmer und eiweißreicher Ernährung des Versuchstiers.

I. Versuchsserie.

A. Eiweißarme Ernährung: Fütterung vom 3. bis 9. I. 1913 mit täglich je 75 g Schmalz, Stärke, Zucker.

Versuche vom 7. bis 9. I. 1913.

		a	b	c	d	e	f	g	h	
		Eingeführt			Ausgeführt					
Datum 1913	Lösung	Menge der eingeführten Lösg. ccm	N-Gehalt mg	Resorptionsdauer Min.	Nicht resorbierter N mg	Resorbierter N mg	Resorbierter N %	Resorpt. in 10 Min. mg	Mittlere Resorption in 10 Min. mg	
7. I.	I. Casein	50	230,060	35	199,971	30,089	13,09	8,59	**9,03**	
8.	II. Casein	50	230,060	28	203,548	26,512	11,53	9,47		
7. I.	I. Erepton	50	204,459	45	115,803	88,656	43,48	19,70	**19,015**	**17,495**
7.	II. Erepton	50	204,459	32	145,786	58,673	28,65	18,33		
9.	III. Erepton	50	204,459	45	129,081	75,378	36,90	16,75	**15,98**	
9.	IV. Erepton	40	163,567	18	136,179	27,388	16,75	15,21		

B. Eiweißreiche Ernährung: Fütterung vom 10. bis 17. I. 1913 mit täglich 400 g Pferdefleisch.

Versuche vom 11. bis 17. I. 1913.

11. I.	I. Casein	50	183,066	35	191,146	8,080	—	—	Keine Resorption		
13.	II. Casein	50	183,066	40	200,627	17,561	—	—			
13.	III. Casein	50	183,066	40	188,797	4,731	—	—			
11. I.	I. Erepton	50	186,222	30	141,163		45,059	24,21	15,02	**15,02**	**17,39**
13.	II. Erepton	50	186,222	47	93,354		92,868	49,87	19,76	**19,76**	

Tabelle III (Fortsetzung).

		a	b	c	d		e	f	g	h
		Eingeführt			Ausgeführt					
Datum 1913	Lösung	Menge der eingeführten Lösg. ccm	N-Gehalt mg	Resorptionsdauer Min.	Nicht resorbierter N mg	N-Überschuß in der ausgeführten Lösung	Resorbierter N mg	Resorbierter N %	Resorpt. in 10 Min. mg	Mittlere Resorption in 10 Min. mg
15. I.	I. Pepton	50	169,053	30	127,172		41,881	24,81	13,96	13,12
15.	II. Pepton	50	169,053	32	129,750		39,303	23,25	12,38	
16. I.	I. Serum	50	521,679	45	479,525		42,154	8,08	9,37	10,505
16.	II. Serum	40	417,343	27	385,905		31,438	7,53	11,64	
17.	III. Serum	50	307,355	38	289,633		37,722	11,52	9,92	9,92

II. Versuchsserie.

A. Eiweißarme Ernährung: Fütterung vom 18. bis 24. I. 1913 mit täglich je 100 g Schmalz, Stärke, Zucker.

Versuche vom 20. bis 24. I. 1913.

20. I.	I. Hydr. Casein	50	115,619	35	92,746		22,873	19,80	6,53	5,70
20.	II. Hydr. Casein	50	115,619	38	97,120		18,499	16,00	4,87	
22. I.	I. Casein	50	184,921	40	181,598	—	3,323	1,79	0,83	Keine Resorption
22.	II. Casein	50	184,921	36	189,016	4,095	—	—	—	
23. I.	I. Pepton	50	104,823	28	76,859		27,964	26,66	9,98	9,465
23.	II. Pepton	50	104,823	30	77,973		26,850	25,64	8,95	
23. I.	I. Serum	50	591,329	36	565,272		26,057	4,41	7,24	7,905
24.	II. Serum	50	591,329	40	557,019		34,310	5,80	8,57	

B. Eiweißreiche Ernährung: Fütterung vom 25. bis 31. I. 1913 mit täglich 500 g Pferdefleisch.

Versuche vom 27. bis 31. I. 1913.

27. I.	I. Hydr. Casein	40	116,052	28	84,607		31,445	27,10	11,23	11,205
27.	II. Hydr. Casein	50	145,065	30	111,531		33,534	23,15	11,18	
29. I.	I. Pepton	50	183,540	40	121,045		62,495	34,13	15,62	14,735
29.	II. Pepton	50	183,540	38	130,919		52,621	28,73	13,85	
31. I.	I. Gliadin	50	99,649	37	68,516		31,133	31,25	8,41	9,205
31.	II. Gliadin	40	79,719	30	49,696		30,023	37,73	10,00	

Aus der ersten Versuchsserie ergeben sich einige interessante Befunde. Wie nach $2^1/_2$ wöchentlichem, durch die Neujahrsferien bedingtem Aussetzen der Versuche dieselben am 7. I. 1913 wieder aufgenommen wurden, zeigte sich als erstes Vorkommnis, daß die beiden bei der eiweißarmen Ernährung geprüften Pro-

dukte Casein und Erepton schlechter resorbiert wurden als früher, und zwar hatte für beide der 10-Minuten-Resorptionswert im ungefähr selben Verhältnis, d. h. um $^1/_3$ bis $^1/_4$ des früher erreichten Wertes abgenommen, sank er doch für Casein von 12,73 mg auf 9,03 mg, für Erepton von 27,46 mg auf 19,015 mg. Nichts lag näher als darin bereits eine Wirkung der eiweißarmen Diät zu erblicken und dieselbe im Sinne der obenerwähnten zweiten Möglichkeit zu deuten. Weil aber die Werte auch während der nachherigen Fleischfütterung nicht wieder zur früher erreichten Höhe anstiegen, war jene Deutung fallen zu lassen gegenüber der Tatsache, daß das Resorptionsvermögen der Fistel während der Ferien schlechter geworden war. Daß sich die Schleimhaut schon um diese Zeit, also noch nicht zwei Monate nach der Operation, in der Tat in einem nicht mehr ganz normalen Zustand befand, beweist der fernere Umstand, daß unvermittelt von einem Tag auf den andern Casein nicht mehr resorbiert wurde. Während dieses drei Tage vorher bei der eiweißarmen Ernährung noch mit Erepton vergleichbare Resorptionswerte ergab, stellten sich vom 11. bis 13. I. 1913 bei der Fleischkost aus drei Versuchen völlig negative Resultate heraus, sogar mit einem Mehr an N in der ausgeführten gegenüber der eingeführten Lösung, was auf Rechnung der sehr erheblichen Schleimsekretion und Epithelabstoßung bei diesen Versuchen zu setzen ist. Obschon letztere Symptome an einen akuten Katarrh der Fistel denken ließen, kann ein solcher doch nicht die alleinige Ursache sein, sondern es muß diese plötzlich auftretende Erscheinung einer absoluten Resorptionsunfähigkeit des Caseins als Folge eines pathologisch veränderten Zustandes der früher normal funktionierenden Schleimhaut erklärt werden. Denn weil Casein früher ganz gleich wie die andern Präparate resorbiert wurde, kann es nun auf einmal nicht an seiner Löslichkeit fehlen noch an ihm selbst liegen, wie Friedländer meinte. Offenbar aber hat er seine negativ ausfallenden Versuche unter ganz ähnlichen pathologischen Verhältnissen gemacht, wie sie für die meinen angenommen werden müssen und so fälschlicherweise auf eine Resorptionsuntauglichkeit des Caseins geschlossen. Für sein Postulat, daß Casein, um resorbiert zu werden, einer vorherigen Spaltung in leichter lösliche Produkte wie Albumosen und Peptone bedürfe, spräche aller-

dings der Umstand, daß sich zu dieser Zeit in der Darmschlinge meines Versuchstiers kein Erepsin nachweisen ließ. Leider wurde zu einer frühern Periode keine Untersuchung gemacht, obschon damals, was höchst wahrscheinlich ist, Erepsin in der Darmschlinge fehlte. Wie dem auch sei, jedenfalls läßt sich für meine positiven Resultate diese Annahme einer vor seiner Resorption erfolgten Spaltung des Caseins durch das Erepsin nur gezwungen machen und ist zurückzuweisen. Daß ferner die auf einmal beobachtete Resorptionsunfähigkeit des Caseins einfach durch das Fehlen von Erepsin erklärt sei, diese Folgerung wird in meinen Versuchen widerlegt durch die Tatsache, daß später, ganz gleich wie jetzt Casein, auch die übrigen Eiweiße und Abbauprodukte in gewissen Perioden nicht mehr resorbiert wurden. Casein steht also in dieser Beziehnng nicht vereinzelt da, und es muß dieser später allgemein werdenden Erscheinung einer plötzlich auftretenden Resorptionsuntauglichkeit aller untersuchten Produkte eine andere Ursache zugrunde liegen als etwa der Mangel an Erepsin, nämlich eine in der Darmschleimhaut durch irgendwelche von der Norm abweichende Prozesse bedingte funktionelle Störung. Es muß auch daran gedacht werden, ob nicht infolge der lange Zeit aufgehobenen Möglichkeit des Einflusses höher gelegener Darmteile — vielleicht Fehlen einer Hormonlieferung — die Resorptionsfähigkeit sinkt.

Für die Frage der Resorptionsgeschwindigkeit bei eiweißarmer verglichen mit eiweißreicher Ernährung läßt sich in der ersten Versuchsserie also nur Erepton vergleichen. Absolute Unterschiede sind keine vorhanden, indem die mittleren 10-Minuten-Respirationswerte bei A aus 4 Versuchen = 17,49, bei B aus 2 Versuchen = 17,39 kaum voneinander abweichen. Dagegen erweist sich als sehr charakteristisch, daß bei der eiweißarmen Diät die Werte im Verlauf der Fütterung deutlich die Tendenz zeigen zu sinken und vom 7. bis 9. I. 1913 sprungweise von 19,015 mg auf 15,98 mg zurückgehen. Gerade das Umgekehrte ereignet sich bei der Fleischernährung, wo die Werte vom 11. bis 13. I. von 15,02 mg auf 19,76 mg wieder ansteigen. Dennoch scheint es unzulässig und verfrüht, aus dieser an sich schönen Gesetzmäßigkeit etwaige Schlüsse ziehen zu können, um so mehr, als im Verlauf der eiweißreichen Periode keine weiteren Versuche mit Erepton ausgeführt werden konnten.

Demgegenüber geht aus einer allgemeinen Betrachtung der zweiten Versuchsserie mit aller wünschenswerten Entschiedenheit hervor, daß die während der Fütterung mit Fleisch erzielten Werte sämtlich höher sind als die der eiweißarmen Periode. Erepton konnte leider nicht mehr geprüft werden, weil davon nicht mehr genügende Quantitäten zur Verfügung standen. Dagegen sind folgende Zahlen gegenüberzustellen: für hydrolisiertes Casein unter A 5,70 mg gegen 11,205 mg unter B — Differenz = 5,505 mg; für Pepton 9,465 mg unter A gegen 14,735 mg unter B — Differenz 5,27 mg. Und zum Vergleich mit dem bei eiweißarmer Diät für Serum erzielten Wert von 7,905 mg kann das in der 1. Versuchsserie bei eiweißreicher Ernährung erhaltene Resultat von 10,50 mg herangezogen werden, so daß sich also auch für Serum zwischen den beiden Ernährungsarten eine Differenz ergibt von 2,595 mg, die wahrscheinlich noch größer ausgefallen wäre, wenn es auch in der zweiten Versuchsserie bei eiweißreicher Kost hätte geprüft werden können. Überblicken wir die drei einzelnen Resultate, so lautet das Ergebnis der zweiten Versuchsserie: Für alle untersuchten Produkte, d. h. für die drei wichtigsten Stufen der Eiweißspaltung — Serum, Pepton, hydrolisiertes Casein — stellen sich bei einem Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeit während eiweißarmer und eiweißreicher Ernährung recht bemerkenswerte Unterschiede heraus zugunsten der letzteren. Mit diesem Endresultat steht nun auch das mit Erepton gewonnene der ersten Versuchsserie in Übereinstimmung, daß im Verlauf einer mehrtägigen eiweißarmen Kost die absoluten Resorptionswerte sinken, um bei nachheriger Fleischnahrung wieder anzusteigen. Will man diese einander ergänzenden und entsprechenden Ergebnisse der beiden Versuchsserien zusammenfassen, so läßt sich der Satz aufstellen: Bei einer während mehreren Tagen fortgesetzten eiweißarmen Ernährung geht die Resorption weniger rasch vor sich als bei eiweißreicher Diät.

Natürlich gelten diese Feststellungen nur für die untersuchten Eiweißpräparate und den Hund. Wie weitgehende Konsequenzen sich daraus ergeben, wenn man sie auch für andere Eiweiße und Abbauprodukte zuläßt und auf den Menschen anwendet, für den die Ernährungsverhältnisse ja ganz analoge sind wie für den Hund, kann nicht weiter erörtert werden,

bis die gefundenen Resultate durch weitere Versuche noch nachgeprüft und bestätigt worden sind.

Weil zwei weitere in der zweiten Versuchsserie unter A mit Casein ausgeführte Versuche wiederum zu keinem positiven Resultat führten, wurde dieses Präparat von nun an nicht mehr geprüft.

Unter B ergaben sodann zwei mit dem Pflanzeneiweiß Gliadin angestellte Versuche, das an Stelle von Serum eingeführt wurde, den verhältnismäßig bedeutenden absoluten Resorptionswert von 9,205 mg in 10 Minuten. Immerhin erreicht dieses Resultat das in der ersten Versuchsserie unter B für Serum notierte von 10,50 mg nicht, so daß Gliadin in der Reihe der in meinen Versuchen auf ihre Resorptionsfähigkeit geprüften Eiweiße nach Serum, aber vor Casein einzureihen ist.

Bis jetzt war noch nicht davon die Rede, ob und in welcher Weise die Resorption von den in meinen Versuchen vorkommenden und nicht zu umgehenden Konzentrationsunterschieden der verschiedenen eingeführten Lösungen abhängig sein könnte. Die geringfügigen Differenzen der durch grobe Abwägung hergestellten 2%igen oder 3%igen Lösungen von Casein, hydrolisiertem Casein, Pepton, Erepton und der übrigen Produkte kommen für diese Frage natürlich nicht in Betracht. Eine Sonderstellung nimmt in dieser Hinsicht einzig Serum ein, dessen Konzentration, wie aus den Tabellen zu ersehen ist, jeweilen bedeutend größer war als die der anderen untersuchten Nährlösungen. Die Frage ist also die: Erklärt sich die relativ sehr gute Resorptionsfähigkeit des Serums, die fast der von hydrolysiertem Casein gleichkommt, etwa dadurch, daß die verwendeten Serum-Eiweißlösungen immer mindestens 5 bis 8%ig waren, und ist ein diesbezüglicher Einwand, der meinen Resultaten für Serum gemacht werden könnte, stichhaltig? Leider hat diese prinzipiell wichtige Frage nicht in befriedigender Weise gelöst werden können, weil immer, wenn sie in Angriff genommen wurde, sich die Darmschleimhaut gerade in jenem abnormen Zustand eines absoluten Respirationsunvermögens befand, von dem schon die Rede war. Es sollten nämlich mit 2%, 4% und 6 bis 8% konzentriertem Serum-Eiweiß Versuche gemacht werden, um aus einem Vergleich der sich ergebenden Resultate zu einem endgültigen Entscheid zu kommen.

In der Tabelle IV finden sich solche die Konzentration berücksichtigenden Serum-Versuche angeführt, doch fielen sie immer negativ aus, wie später noch zu zeigen sein wird. Immerhin kann im Anschluß an Tabelle III hier wenigstens ein gelungener und zuverlässiger Konzentrationsversuch mitgeteilt werden, der zum Ergebnis führte, daß die Resorption von den nicht übermäßig großen Konzentrationsunterschieden in meinen Versuchen unbeeinflußt zu sein scheint. In der ersten Versuchsserie sind unter B zwei Versuche mit ca. 7 % Serum (in 50 ccm 521,679 mg N) zusammengestellt, die im Mittel einen 10-Minuten-Resorptionswert ergaben von 10,50 mg. Daneben erwies ein allerdings nicht am selben Tage angestellter Versuch mit einer 4 %igen Serumlösung (in 50 ccm 327,355 mg N) den davon nur wenig differierenden Wert von 9,92 mg in 10 Minuten. Wenn man diesen einzigen und nicht nachkontrollierten Versuch gelten lassen darf, so scheint keine wesentliche Abhängigkeit der Resorption von innerhalb gewisser Grenzen beobachteten Konzentrationsunterschieden zu existieren.

Tabelle IV.

Vergleich der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen Hämoglobin, Serum und hydrolysiertem Casein. Versuche mit Aminosäuren und Traubenzucker, negative Resultate.

Versuche vom 5. bis 13. II. und 22. bis 28. II. 1913.

		a	b	c	d		e	f	g	h
		Eingeführt			Ausgeführt					
Datum 1913	Lösung	Menge der eingeführten Lösg. ccm	N-Gehalt mg	Resorptionsdauer Min.	Nicht resorbierter N mg	N-Überschuß in der ausgeführten Lösg.	Resorbierter N mg	Resorbierter N %	Resorpt. in 10 Min. mg	Mittlere Resorption in 10 Min. mg
5. II.	I. Pepton	50	177,884	31	176,038		1,846	1,04	0,59	0,805
5.	II. do.	50	177,884	40	173,775		4,109	2,31	1,02	
5. II.	I. Peptisch verdautes Pepton	30	114,154	30	125,089	10,935	—	—	—	Keine Resorption
5.	II. do.	50	190,257	36	203,717	13,460	—	—	—	
6. II.	I. Serum-Hämoglobin	50	790,461	40	778,860		11,601	1,46	2,90	Keine Resorption
6.	II. do.	40	632,369	36	632,416	0,047	—	—	—	
7.	III. do.	40	163,800	25	167,867	4,067	—	—	—	

Tabelle IV (Fortsetzung).

		a	b	c	d		e	f	g	h
		Eingeführt			Ausgeführt					
Datum 1913	Lösung	Menge der eingeführten Lösg. ccm	N-Gehalt mg	Resorptionsdauer Min.	Nicht resorbierter N mg	N-Überschuß in der ausgeführten Lösg.	Resorbierter N mg	Resorbierter N %	Resorpt. in 10 Min. mg	Mittlere Resorption in 10 Min. mg
			Zucker		Zucker		Zucker		Zucker	
10. II.	I. Traubenzucker	40	710,000	30	389,770		320,23	45,10	106,74	107,235
10.	II. do.	40	631,600	22	394,590		237,01	37,52	107,78	
12. II.	I. Hydrolysiertes Casein	50	123,204	31	99,012		24,192	19,63	7,80	7,11
12.	II. do.	40	98,563	29	79,923		18,640	18,90	6,42	
13. II.	I. Hämoglobin	50	91,350	30	79,417		11,933	13,08	3,97	3,96
13.	II. do.	40	73,080	35	59,256		13,824	18,94	3,95	
22. II.	I. Serum	50	608,762	30	584,211		24,551	4,03	8,18	8,315
22.	II. do.	50	608,762	33	580,543		28,219	4,63	8,55	
24. II.	I. Hämoglobin	40	100,497	23	92,045		8,452	8,41	3,67	3,43
24.	II. do.	40	100,497	20	94,097		6,400	6,44	3,20	
24. II.	I. Serum	50	152,544	27	158,023	5,479	—	—	—	Keine Resorpt.
24.	II. do.	50	152,544	29	159,669	7,125	—	—	—	
25. II.	I. Serum + Aminosäuren	50	96,579	27	96,751	0,172	—	—	—	Keine Resorption
25.	II. do.	50	96,579	30	95,990		0,589	—	—	
27. II.	I. Glykokoll + d-Alanin	50	145,716	34	105,761		39,955	27,42	11,75	8,77
27.	II. do.	50	81,844	30	64,467		17,377	21,23	5,79	
27.	III. do.	50	81,844	25	81,948	0,104	—	—	—	Keine Resorpt.
			Zucker							
28. II.	I. Traubenzucker	40	853,200	25	498,43		354,77	41,58	141,91	140,61
28.	II. do.	40	853,200	26	490,99		362,21	42,46	139,31	

In der vierten Versuchstabelle finden sich in der Zeit vom 5. bis 7. II. 1913 vorerst einige Versuche, die negative Resultate ergaben. Ganz gleich wie es seinerzeit für Casein beobachtet und besprochen wurde, stellte sich nun auch für die übrigen untersuchten Produkte diese merkwürdige Erscheinung eines völligen Resorptionsvermögens der Darmschleimhaut ein.

Eigentümlich muß dabei nur erscheinen, daß dieser abnorm Zustand so akut und unvermittelt, ohne daß sich etwa eine sukzessive Abnahme der Resorption konstatieren ließ, auftrat.

Gehen wir näher auf die vorliegenden negativen Resultate ein, so ergibt sich für das am 5. II. 1913 geprüfte Pepton der ganz geringe und innerhalb der Fehlergrenzen fallende 10-Minuten-Resorptionswert von 0,805 mg. Das am gleichen Tage eingeführte, einer vorherigen 24stündigen künstlichen Pepsinverdauung unterworfene Pepton zeigte in beiden Versuchen, analog wie es früher schon für Casein beobachtet wurde, in der ausgeführten Lösung ein beträchtliches Mehr an N als in der eingeführten. Am 6. II. 1913 sodann wurde ein Gemisch von Serum und Hämoglobin untersucht. Während der erste Versuch eine kleine Resorption ergab, fielen die beiden andern wieder negativ aus, wovon der zweite in der ausgeführten Lösung mit fast absoluter Genauigkeit denselben N-Gehlt aufwies wie in der eingeführten.

In Anbetracht dieser negativ ausfallenden Versuche konnte man an alle möglichen pathologischen Vorkommnisse denken. Da jegliches Symptom fehlte, konnte es nichts Ernstliches sein. Man konnte auch als Ursache einen Darmkatarrh vermuten, obschon sich für eine solche Annahme keine weiteren Symptome nachweisen ließen, als eine bei einzelnen Versuchen besonders auffallende vermehrte Schleimproduktion. Dennoch wurde die Fistel während einiger Tage therapeutisch mit einer verdünnten Borlösung mehrmals durchgespült. Um sich ferner zu vergewissern, ob dieses abnorme Verhalten der Darmschleimhaut in degenerativen anatomischen Veränderungen derselben begründet war oder eine nur vorübergehende funktionelle Störung darstellte, wurden nach dreitägiger Pause am 10. II. 1913 zwei Versuche mit Traubenzucker gemacht. Überraschenderweise ergaben dieselben den sehr beträchtlichen Resorptionswert von 107,235 mg in 10 Minuten, eine Zahl, die weit höher steht als die in der besten Periode der Fistel für die Spaltprodukte der Eiweißkörper erzielten Resultate. Dadurch war erstens nachgewiesen, daß jene Störung des Darmepithels als eine rein funktionelle aufzufassen war, und ferner festgestellt, daß das Resorptionsvermögen desselben nur für Eiweiße und deren Abbauprodukte darniederlag und nicht für Traubenzucker, eine

Wahrnehmung, die durch einen Vergleich jener negativen Resultate für Eiweiße und dieser unverhältnismäßig hohen Werte für Traubenzucker in geradezu frappanter Weise erhellt wird. Diese Feststellungen ließen also erwarten, daß sich die Darmschleimhaut auch für Eiweißkörper wieder erholen würde, um so mehr, als an eine Nekrose oder dgl. nicht zu denken war. In der Tat war es in einer weiteren Reihe von Versuchen noch möglich, Hämoglobin zu untersuchen. Dasselbe wurde zuerst mit hydr. Casein verglichen und später, um seine Stellung in der Reihe der Eiweiße noch genauer präzisieren zu können, mit Serum. Der letztere Vergleich ergibt, daß Hämoglobin um fast 60% schlechter resorbiert wird als Serum, so daß, wenn man den 10-Minuten-Resorptionswert für Serum gleich 20 setzt, wie die ersten damit ausgeführten Versuche erwiesen, sich für Hämoglobin der Wert gleich 8 ergibt. Hämoglobin wird demnach verhältnismäßig sehr schlecht resorbiert, eine Tatsache, die übrigens schon genügend bekannt sein dürfte. Gibt doch Falta an, daß 25% des Hämoglobins den Darm unausgenützt verlassen. Und erst kürzlich stellte Steck[1]) in seinen Versuchen fest, daß Hämoglobin in gleich geringen Mengen wie andere Eiweißkörper nicht imstande ist, N-Gleichgewicht herzustellen, was er z. T. seiner schlechten Resorptionsfähigkeit, z. T. seiner histonähnlichen Konstitution zuschreibt.

Nach diesen mit Hämoglobin gelungenen Versuchen sollten vor allem noch Aminosäuren geprüft werden. Doch versagte die Fistel abermals. Wie akut der schon besprochene abnorme Zustand wieder auftrat, geht daraus hervor, daß am 24. II. vormittags Hämoglobin noch recht ordentlich resorbiert wurde, während sich am Nachmittag desselben Tages für ein zu Konzentrationsversuchen zweifach mit physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Serum neuerdings ganz ähnliche negative Resultate herausstellten wie früher. Derselbe Mißerfolg wiederholte sich am nächsten Tage für ein Serum-Aminosäuregemisch, bei dem der resorbierte Anteil des Aminostickstoffs, vom resorbierten Serum-N getrennt, berechnet werden sollte. Die Versuche sind technisch sehr gelungen, indem ziemlich genau gleichviel N ausgeführt wie eingeführt wurde. Nach einem

---

[1]) Hans Steck, diese Zeitschr. 49, 195, 1913.

Tag Ruhepause für die Fistel ergab sich für die beiden Aminosäuren Gykokoll + d-Alanin noch der Resorptionswert von 11,75 mg, doch sank die Resorption schon gleichen Tages in einem zweiten Versuch auf 5,79 mg, und schließlich in einem dritten Versuch auf Null herunter. Es ist natürlich nicht statthaft, aus diesen unter abnormen Verhältnissen gewonnenen Resultaten weiteres zu schließen, so daß die Frage nach der Resorptionsgeschwindigkeit der Aminosäuren nicht beantwortet werden kann. Um so interessanter steht die Tatsache da, daß zu einer Zeit, wo selbst Aminosäuren nicht mehr resorbiert wurden, Traubenzucker nach wie vor die gleich schönen, ja sogar in den letzten Versuchen vom 28. II. 1913 noch größeren absoluten Resorptionswerte aufwies als bei den ersten zur Kontrolle der Darmschleimhaut vorgenommenen Zuckerversuchen. Wenn man sich diese letzten Resultate gegenüberstellt, muß man zum Schlusse kommen, daß sich Aminosäuren und Traubenzucker in bezug auf ihre Resorptionsgeschwindigkeit weit voneinander entfernen.

Endlich ergibt sich aus der Feststellung, daß bei gestörter physiologischer Funktion der Darmschleimhaut reine Aminosäuren gar nicht besser resorbiert werden als die übrigen Eiweiße und Abbauprodukte, noch eine praktische Anwendung, auf die hier hingewiesen werden darf. Bekanntlich tendieren gewisse Spezialisten dahin, bei Darmkatarrhen aufgespaltene Eiweißpräparate zu verordnen, in der Meinung, daß solche besser verwertet würden als genuine Eiweiße, eine Vorstellung, die durch die vorliegenden negativen Resultate für Aminosäuren in keiner Weise gerechtfertigt wird. Es scheint eben bei analogen abnormen Bedingungen, wie sie die Fistel meines Versuchstiers um diese Zeit darbot, für alle Eiweiße und Abbauprodukte ein absolutes Resorptionsunvermögen der Darmzellen zu existieren, so daß es gleichgültig sein kann, mit welchen Eiweißprodukten man den Bedarf zu decken sucht.

Zusammenfassung der Resultate.

1. Die Thiry-Vellafistel erweist sich zur Untersuchung der Resorptionsgeschwindigkeit der Eiweißkörper als in mancher Beziehung sehr geeignet und zeigt viele Vorteile gegenüber dem akuten Verfahren. Indem dabei alle indi-

viduellen Verschiedenheiten und die mannigfachen (durch die Operation verursachten) die Resorption ungünstig beeinflussenden Momente jenes Verfahrens ausgeschaltet sind, ergeben sich für die einzelnen Produkte konstante und miteinander übereinstimmende, sehr bemerkenswerte absolute und in Prozenten des eingeführten N berechnete relative Resorptionswerte. Immerhin nimmt das Resorptionsvermögen der Darmschleimhaut mit der Zeit und im Verlauf der Versuche merklich ab, eine Erscheinung, die schließlich in einen akut auftretenden abnormen Zuckerstand übergehen kann, der sich dadurch äußert, daß sich für alle Eiweißkörper keine Resorption mehr nachweisen läßt. Daß diese Störung funktioneller Natur ist, beweist der Umstand, daß zur selben Zeit Traubenzucker normal resorbiert wird, und die Tatsache, daß sich die Darmschleimhaut auch für die Eiweißprodukte vorübergehend wieder erholen kann.

2. Die geprüften genuinen Eiweiße lassen sich nach ihrem absoluten 10-Minuten-Resorptionswert in folgender arithmetischer Reihe anordnen: Serum = 20, Gliadin = 16, Casein = 12, Hämoglobin = 8. Gegenüber der früher von Friedländer gemachten Beobachtung, Casein werde nicht resorbiert, wurde in den ersten Versuchen, zu einer Zeit, da die Darmschleimhaut normal funktionierte, festgestellt, daß Casein tatsächlich wie die übrigen Eiweiße resorbiert wird.

Eine wesentliche Abhängigkeit der Resorption von innerhalb gewisser Grenzen beobachteten Konzentrationsunterschieden konnte experimentell nicht festgestellt werden und scheint nicht zu existieren.

3. Die Frage der Resorptionsgeschwindigkeit zwischen höheren und tieferen Spaltprodukten wurde dahin entschieden, daß höhere Stufen wie Pepton — verglichen mit Erepton — gleich schnell — verglichen mit total hydrolysiertem Casein — bedeutend rascher resorbiert werden. Aus dieser Tatsache, die im wesentlichen mit den Befunden von Nolf und seinen Mitarbeitern übereinstimmt, ergibt sich die fundamental wichtige Folgerung, daß physiologischerweise im Darm nicht alles Eiweiß bis zu den letzten Bausteinen aufgespalten und daraus indifferentes Bluteiweiß synthetisiert wird, sondern daß eine ergiebige Menge von Nahrungsstickstoff schon in Form höherer

Stufen, wie Albumosen und Peptone, durch das Darmepithel resorbiert wird.

4. Während in einer ersten Versuchsserie an einem Beispiel gezeigt werden konnte, daß bei eiweißarmer Ernährung des Versuchstiers die Resorptionswerte im Verlaufe der mehrtägigen Periode sinken, um bei nachheriger eiweißreicher Kost wieder anzusteigen, ergaben sich in einer zweiten Versuchsserie recht deutliche Resorptionsunterschiede zwischen den beiden Ernährungsarten zuungunsten der eiweißarmen Ernährung, eine Feststellung, die sich dadurch erklären läßt, daß durch den N-Mangel die Darmzellen in ihrer physiologischen Funktion erheblich beeinträchtigt werden.

5. Zu einer Zeit, wo alle Eiweiße und selbst total gespaltene Abbauprodukte wie Aminosäuren von der Darmschleimhaut nicht mehr resorbiert wurden, ergab sich für Traubenzucker nach wie vor eine von der Norm nicht abweichende Resorption. Hieraus geht hervor, daß die Spaltung des Eiweißes nicht zu einer Resorptionsfähigkeit, wie die des Traubenzuckers ist, führt.

Untersuchungen über die Kohlensäurebildung in der Leber.

Von

Eduard Freise (Leipzig).

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut zu Straßburg.)

(Eingegangen am 21. Juli 1913.)

Mit 1 Figur im Text.

Die nachstehend mitgeteilten Untersuchungen hatten zur Aufgabe, einer Frage des intermediären Stoffwechsels näherzutreten, um deren Bearbeitung sich bereits J. Pohl[1]) und O. Hanssen[2]) im Laboratorium von Hofmeister bemüht haben; nämlich der Frage, welche Stoffe als unmittelbare Vorstufen der im Körper gebildeten Kohlensäure zu betrachten sind. Die Erkenntnis, daß die chemischen Vorgänge im Tierkörper nicht allenthalben nach dem gleichen Plane ablaufen, daß möglicherweise jedes Organ einen spezifischen Stoffwechsel besitzt, läßt es unwahrscheinlich erscheinen, daß die Antwort auf die gestellte Frage bei allen Organen im gleichen Sinne ausfallen wird. Es bleibt daher nichts übrig, als die Organe einzeln nach dieser Richtung zu untersuchen und mit allgemeinen Schlüssen zurückzuhalten, bis die ermittelten Tatsachen einen umfassenderen Überblick ermöglichen.

Meine Untersuchungen beziehen sich ausschließlich auf die Säugetierleber. Da die Ausarbeitung einer wirklich befriedigenden Methode Zeit und Mittel in hohem Maße in Anspruch nahm, stellen meine Versuche nur einen ersten Schritt in der angedeuteten Richtung dar, denen weitere aus dem hiesigen Institut folgen sollen.

---

[1]) Arch. f. experim. Pathol. u. Pharmakol. 37, 413, 1896.

[2]) Diese Zeitschr. 22, 433, 1909.

I. Versuchsanordnung.

Da der oxydative Abbau erfahrungsgemäß so rasch verläuft, daß die normal auftretenden Vorstufen des Kohlendioxyds nie in größerer Menge in den Geweben angetroffen werden, so hat Pohl[1]) den Weg eingeschlagen, Tieren per os Stoffe zuzuführen, welche ihrer chemischen Natur nach als Vorstufen der Kohlensäure in Betracht kommen, und dann festzustellen, ob sie in der Tat leicht in diese übergeführt werden oder nicht. Der gleiche Weg steht auch bei Untersuchung des Oxydationsvermögens der einzelnen Organe offen. Die Hauptschwierigkeit liegt hier in der gleichmäßigen Zufuhr des benötigten Sauerstoffes. Man hat sie auf zweierlei Art zu erreichen gesucht:

1. Durch Zerkleinerung des Organs und Zusammenbringen mit Luft bzw. Sauerstoff, wobei je nach dem Grade der Zerkleinerung und der Innigkeit der Berührung mit Sauerstoff dieser Zweck in verschieden hohem Grade erreicht wurde.

2. Durch günstige Nachahmung der Zirkulation mittels arterialisierten Blutes oder sauerstoffreicher Lösungen.

Versuche der ersten Art — Zusammenbringen von Organbrei mit Luft oder Sauerstoff — sind von Battelli und Stern[1]), von Lussana und O. Hanssen ausgeführt worden. Da bei dieser Anordnung die Zahl der bei der Oxydation beteiligten Bedingungen gegenüber der Norm vermindert ist, bietet sie, soweit sie positive Ergebnisse liefert, große Vorteile für bestimmte Fragestellungen. Sie kann aber von dem Umfang der Oxydationsvorgänge keine sichere Vorstellung geben und versagt, wo die Oxydation an die Intaktheit des anatomischen Baues geknüpft ist, ganz. Daß die Herstellung des Organbreis mit einer Einbuße an physiologischer Leistung verknüpft ist, läßt sich schon aus der immer wieder festgestellten Tatsache (Battelli-Stern, Hanssen) entnehmen, daß die Zerkleinerung des Organs über eine gewisse Grenze hinaus, z. B. Verreiben mit Quarzsand, trotz der dabei erreichten Vergrößerung der

[1]) Journ. de Physiol. et Pathol. générale **9**, 1, 34, 228, 410, 737, 1907 u. folg. — Compt. rend. Soc. Biol. **62**, 1116, 1907; **65**, 489, 1908; **66**, 372, 411, 1909; **70**, 838, 1911. — Diese Zeitschr. **21**, 487, 1909; **30**, 172, 1910; **31**, 478, 1910; **33**, 314, 1911; **34**, 263, 1911; **36**, 114, 1911; **38**, 163, 1911.

Gesamtoberfläche den Gaswechsel nicht mehr steigert sondern herabsetzt. Es ist aber überdies nicht auszuschließen, daß die bei der Zerkleinerung funktionsunfähig gewordenen Zellen und Zellteile sich an den chemischen Vorgängen in anderer Weise beteiligen als die intakt gebliebenen und so das Gesamtresultat in nicht übersehbarer Weise beeinflussen.

Auch die von C. Ludwig[1]) in die physiologische Technik eingeführte Durchströmungsmethode ist von solchen Mängeln nicht frei, wenn sie sich auch bei zweckmäßiger Ausführung den im lebenden Organismus gegebenen Bedingungen ungleich mehr nähert.

Für die uns beschäftigende Frage war es die nächste Aufgabe, einen der Durchblutungsapparate so zu modifizieren, daß es möglich wurde, die von einem isolierten durchbluteten Organ produzierte CO_2 quantitativ aufzufangen. Der Konstruktion zugrunde gelegt wurde das im hiesigen Institut bewährte, von Mandel[2]) beschriebene Modell.

Aus einer Woulffschen Flasche von 2900 ccm Inhalt wird das Blut mittels einer rhythmisch arbeitenden Pumpe in eine kleinere Flasche von 600 ccm Inhalt geführt. Aus dieser geht erstens eine bis zur mittleren Höhe der Flasche reichende Glasrohrleitung ab, die einen Nebenschluß nach dem Prinzip Hoffmann darstellt, und mit einer Mikrometerschraube montiert für eine feine Regulierung des Blutdrucks Gewähr leistet; zweitens führt eine Glasrohrleitung auf den Boden des Gefäßes. Diese ist mit zwei Luftfallen, Manometer und Thermometer versehen und leitet das Blut in das Organ. Aus diesem wird das Blut durch einen als Saug- und Druckpumpe wirkenden starken Gummiballon, der entsprechend dem Hub der Hauptpumpe rhythmisch eingedrückt wird zu einem Arterialisator geführt. Es passiert diesen und tritt in das große Reservoir zurück. Durch eine dritte Öffnung dieses Reservoirgefäßes wird Sauerstoff eingeleitet. Dieser tritt aus einer Bombe zuerst in ein Reduzierventil, dann durch eine Gasuhr, weiterhin durch ein Rotameter und gelangt nach Passage einer Waschflasche auf den Boden des Reservoirgefäßes. Der Sauerstoff bewegt sich dann entgegen dem Blutstrom durch den Arterialisator, und das nun ausströmende Gasgemenge gelangt in die der Absorption des Kohlendioxyds dienenden Barytflaschen. Das Organ liegt in einem bei 40° gehaltenem Rezipienten. Das Innere dieses Rezipienten ist durch eine in eine doppelte Umrahmung eingesenkte Schale luftdicht abgeschlossen. Es ist Vorsorge ge-

[1]) Arch. di fisiolog. 2, 445, 1905; 3, 113, 1906. — Compt. rend. Soc. Biol. 66, 250, 1909.

[2]) Zeitschr. f. Biol. Technik u. Methodik 1, 44, 1908.

troffen, daß das im Rezipienten etwa aussickernde Blut durch einen Nebenschluß in das Hauptgefäß zurückgeführt werden kann.

Der Arterialisator, auf dessen geeignete Konstruktion ich besonderes Gewicht gelegt habe, ist abweichend von dem üblichen Typus derart gebaut, daß das Blut in sehr breiter und dünner Schicht mit dem vorbeiströmenden Sauerstoff in Berührung tritt. Dadurch ist für eine vollständige Sättigung des Blutes mit Sauerstoff sowie für gute Abgabe des Kohlendioxyds gesorgt. Es hat sich in meinen wie auch in anderen im hiesigen Institut ausgeführten Versuchen herausgestellt, daß solche maximale Durchlüftung des Durchströmungsblutes für eine gute Nachahmung der Lebensvorgänge kaum zu entbehren ist. Über die nähere Einrichtung soll später berichtet werden.

Die Kohlensäure wurde nach Absorption in Barytwasser durch Titration nach Pettenkofer ermittelt.

Die verwendeten Absorptionsgefäße sind in Anlehnung an in der Laboratoriumstechnik verwendete Waschflaschenmodelle folgendermaßen konstruiert. Sie bestehen aus einem 50 cm hohen und 5 cm weiten Glaszylinder mit gut angeschliffenem Verschluß. Die Einrichtung ist aus beistehender Figur ersichtlich. Das vom Arterialisator abströmende Gasgemenge tritt durch das lange gerade Rohr in die Spirale, wo es in Blasen stets unter Mitnahme von Barytwasser einen etwa 200 cm langen Weg zurücklegt und gelangt dann durch die zweite Öffnung des Zylinders nach außen. Die Berührung des Gases mit dem Barytwasser ist bei gleichmäßiger Gasdurchleitung sehr innig. Die Absorption unter den gegebenen Bedingungen vollständig. Entsprechend einem Vorschlage Warburgs stehen die Flaschen in einem auf etwa 80° erwärmten Wasserbad. Die Barytflaschen wurden beschickt mit gemessener Menge einer etwa 7%igen Barytlösung. Die Lösung wurde vor jeder Durchblutung auf ihren Titer geprüft. Titriert wurde mit einer Oxalsäurelösung, 2,8636 g krystallisierte Oxalsäure pro Liter enthaltend, von der 1 ccm 1 mg Kohlensäure entspricht.

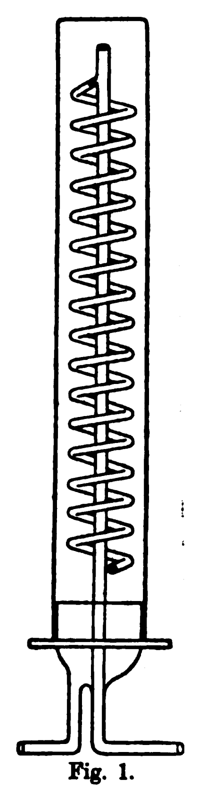


Fig. 1.

Zur Bestimmung der Kohlensäure im Blute und in den Organen wurde sie abdestilliert. Dabei benutzte ich eine Anordnung, die einer gebräuchlichen Methode nachgebildet war.

Ein kurzhalsiger Jensener 1-Liter-Rundkolben wird mit 30 ccm Paraffin. liquid. 200 ccm ausgekochtem kohlensäurefreiem destillierten Wasser und einigen Siedesteinen beschickt; dann wurden aus einer Normalpipette 50 ccm Blut hinzugefügt. Der als Verschluß dienende Gummi-

stopfen hatte 2 Bohrungen. Die eine trug einen etwa 30 cm langen Rückflußkühler, der durch einen kurzen Gummischlauch mit einer der oben beschriebenen Absorptionsröhren verbunden war, die andere eine Glasröhre, die bis auf den Boden des Kolbens reichte und außen mit einem Glashahn versehen war. Durch diese wurden nun 50 ccm einer 10%igen Citronensäure in den Kolben eingeführt und dann während der Destillation durch Natronkalk und Kalilauge von Kohlensäure befreite Luft zugeführt. Der Glashahn diente dabei zur Herstellung eines gleichmäßigen Luftstromes. Die Dauer der Destillation wurde auf $1^1/_2$ Stunden ausgedehnt und in dieser Zeit ein Volumen von etwa 6000 bis 8000 ccm Luft durchgeschickt. Die einzige Schwierigkeit bei diesem Verfahren bietet bei den Blutkohlensäurebestimmungen die Verhütung der Schaumbildung. Das flüssige Paraffin war aus diesem Grunde nicht zu entbehren. Es erwies sich als nützlich nach anfänglichem Erhitzen mit großer Flamme, noch vor dem Eintritt des Siedens, die Wärmezufuhr zu beschränken und im weiteren Verlaufe möglichst gleichmäßig zu gestalten. Die Hauptmasse der Kohlensäure geht nach Eintritt des Siedepunktes über. Die weitere Destillation bedarf nur geringer Aufsicht.

Zur Beurteilung dieser Methodik wurden Kontrollversuche vorgenommen. Salzsäure geht bei dieser Anordnung nicht über. Die verwendete Citronensäure ergab bei Anwesenheit von Kochsalz nach $1^1/_2$ stündigem kräftigen Sieden keinen Ausschlag. Kontrollproben von Blut allein und Blut nach Zusatz einer gewogenen Menge geglühten Natriumbicarbonats ergaben zufriedenstellende Resultate. Kontrollproben desselben Blutes ergaben in verschiedenen Destillationen Fehler von wenigen Zehntelmilligramm.

In gleicher Weise wurde die Leber behandelt. 50 g Leber wurden mit der Schere sehr fein zerschnitten und mit kohlensäurefreiem Wasser in den Rundkolben gespült. Die Destillation dann in gleicher Weise wie beim Blut durchgeführt. Versuche mit verschiedener Zerkleinerung ergaben, daß die Zerkleinerung mit der Schere genügte. Kontrollproben ergaben ähnliche befriedigende Resultate, wenngleich die Übereinstimmung von Parallelbestimmungen wohl wegen der nie ganz gleichen Beschaffenheit der Leberstücke minder vollkommen war, die Differenzen betrugen 1,68 bis 2,2 mg CO_2 pro 100 g Organ.

Der Verlauf einer Durchblutung gestaltete sich folgendermaßen.

Der Apparat wird mit reinem Sauerstoff gefüllt und auf seine Dichtigkeit geprüft, das Wasserbad auf 40° erwärmt. (Bei einer Reihe

von Versuchen bleibt es zweckmäßig dauernd geheizt.) 2 l Blut, im Schlachthaus in gründlich gesäuberten Gefäßen frisch aufgefangen und geschlagen, werden koliert durch den obengenannten Nebenschluß für Sickerblut mittels der Saugpumpe in den Apparat eingeführt, gleichzeitig wird der Arterialisator und die Sauerstoffdurchblutung in Gang gesetzt. Die von diesem Moment bis zur Organeinfügung entweichende Kohlensäure wird in einem Barytzylinder getrennt aufgefangen. 2 mal 50 ccm Blut bleiben zur Bestimmung der im Blut zu Anfang vorhandenen Kohlensäure, die Bestimmung wird gleich nach Beginn des Versuches begonnen, um den durch die Kohlensäurebildung im Blut auftretenden Fehler möglichst auszuschalten. Die Temperatur des Blutes ist nach etwa 30 Minuten auf 38° bis 40° gebracht. Dann wird das Versuchstier durch beide Carotiden entblutet, die Leber in der üblichen Weise präpariert, mit Kanülen versehen (Dauer 8 bis 12 Minuten), gewogen und in dem Organrezipienten die Vena portae mit dem das Blut zuführenden, die Vena cava superior mit dem abführenden Gummischlauch verbunden. Zugleich wird der Dreiweghahn der das ausströmende Gas führenden Schlauchleitung umgeschaltet und so die von jetzt an abgegebene Kohlensäure in einem besonderen Barytzylinder geleitet. Die während des Versuches ausgeschiedene Kohlensäure wird in jeder Viertelstunde (oder einer anderen Zeitperiode) getrennt aufgefangen, derart, daß das jedesmal freiwerdende Ende der Dreiwegleitung mit einem neuen Barytzylinder verbunden wird.

Zu Beginn einer jeden Viertelstunde wird Zeit, Blutdruck, Temperatur und Stand des Gasuhr notiert, während des Versuches werden 1 bis 2 Proben aus dem abführenden Gefäß entnommen und aus der in der Zeiteinheit abfließenden Blutmenge die Geschwindigkeit des Blutstromes bestimmt.

Dieses Blut wird, ebenso wie die sonst entstehenden Verluste, mit dem Gesamtblut am Ende des Versuches vereinigt.

Der Blutstrom wird durch Regulierung des Druckes möglichst gleichmäßig erhalten, der Sauerstoffstrom durch genaue Einstellung eines Rotameters.

Nach Beendigung der Durchblutung wird die Bewegung der Pumpe und des Arterialisators abgestellt und nun in einer besonderen Barytflasche eine bestimmte Menge der im Apparat bleibenden Luft aufgefangen, zur Bestimmung der Kohlensäure der Residualluft, dann der Sauerstoffstrom unterbrochen. Hierauf wird das Organ entfernt, gewogen, schließlich das Blut aus dem Apparat gepumpt und mit dem während des Versuches abgelassenen und dem schon in Verlust gegangenen Blut vereinigt. Mit 2 Proben Blut zu 50 ccm werden Kohlensäurebestimmungen angestellt, ebenso mit 50 g Leber.

Während der Dauer des Versuches geht ein Strom kohlensäurefreier Luft durch den Rezipienten, um die von dem Organ perspirierte oder etwa vom Sickerblut abgegebene Kohlensäure aufzunehmen; auch diese wird in einer gesonderten Barytflasche aufgefangen.

In den Versuchen, in denen die Einwirkung bestimmter chemischer Körper auf die Kohlensäureproduktion der isolierten Leber untersucht wurde, geschah die Zufuhr derart, daß man die Substanzen in etwa 4%iger Lösung nach exakter Neutralisation, vor dem letzten (obengenannten) Schaumfänger langsam in den blutzuführenden Gummischlauch einspritzte, etwa während 15 bis 20 Minuten, um einmal eine plötzliche Überschwemmung des Organs und zweitens eine Verschleuderung der Substanz in der relativ großen Blutmenge zu verhüten.

Zur Bestimmung der von dem Organ gebildeten Kohlensäure kommen bei dieser Versuchsanordnung folgende Faktoren in Betracht:

1. CO_2-Gehalt des Blutes zu Beginn des Versuches . . Bl_v
2. CO_2-Gehalt des Blutes nach Beendigung des Versuches Bl_n
3. Die Menge der im Blut selbst unter den im Apparat gegebenen Bedingungen unabhängig von der Leber gebildeten CO_2 . . . . Bl_b
4. CO_2-Gehalt des Organs zu Beginn des Versuches . . Org_v
5. CO_2-Gehalt des Organs nach Beendigung des Versuches unter Abrechnung des in ihm angeschoppten Bln . Org_n
6. Die aus dem Apparat vor dem Einfügen des Organs abgeführte CO_2 . . . . Khs_v
7. Die aus dem Apparat während des Organversuches abgegebene CO_2 . . . . Khs
8. Die im Apparat nach Herausnahme des Organs verbleibende CO_2 . . . . Khs_n
9. Die vom Organ während des Versuches von der Oberfläche abgegebene CO_2 . . . . Khs_p

Die Menge der vom Organ produzierten CO_2 läßt sich dann in folgender Weise berechnen:

$$(Bl_n - Bl_v - Bl_b) + (Org_n - Org_v) + Khs_v + Khs + Khs_n + Khs_p = x$$

oder

$$(Bl_n + Org_n + Khs_v + Khs + Khs_n + Khs_p) - (Bl_v + Org_v + Bl_b) = x.$$

x wäre dann die Menge CO_2, die von einem Organ von bestimmtem Gewicht in einer bestimmten Zeit, bei bestimmter Temperatur usw. abgegeben wird. Um geeignete Vergleichs-

zahlen zu erhalten, wurden die erhaltenen Werte auf Kilo Organ und Minute berechnet.

Kritik der Methode. Es ist einleuchtend, daß ein noch so günstig verlaufener Durchströmungsversuch nur eine Annäherung an die physiologischen Verhältnisse darstellt. Es kommen da mancherlei Fehlerquellen in Betracht.

1. Die unvermeidliche Unterbrechung der Zirkulation, wodurch ein Teil der Leberzellen geschädigt werden kann. Soll das vermieden werden, so darf die Zeit zwischen Entblutung des Tieres und Einsetzen der Leber zweckmäßig 10 bis 15 Minuten nicht überschreiten. Es ist das nur Sache der Übung, es gelang nicht selten, die Operation in 8 bis 9 Minuten auszuführen.

Blut und Organ sind bei einer gleichbleibenden Temperatur von 38° bis 40° zu halten, das Blut muß vor Einsetzen des Organs auf diese Temperatur gebracht sein.

Die Herausnahme und Übertragung des Organs kann auch durch Abkühlung die Kohlensäurebildung beeinträchtigen. Ich habe den Einfluß der Temperatur in einigen länger dauernden Versuchen festzustellen versucht. Die CO_2-Produktion betrug bei übernormaler Temperatur:

		CO_2 pro Kilo und Minute mg
1.	43° bis 45°	103,8
2.	41° „ 45°	99,17
bei niedriger Temperatur		
1.	29° bis 33°	22,47
2.	29° „ 36°	27,84
3.	33° „ 35°	37,55
4.	31° „ 32°	36,79
5.	34° „ 38°	26,45

Die Zahlen gelten nur annäherungsweise, da die Kohlensäurebildung des Blutes selbst unter diesen abnormen Verhältnissen nur rechnerisch berücksichtigt werden konnte. Jedenfalls erscheint der Einfluß der Temperaturerniedrigung unter den in Frage tretenden Bedingungen weit erheblicher als der der Temperatursteigerung. In meinen Versuchen wurde die Temperatur zwischen 38° bis 40° gehalten.

2. Die Verwendung von geschlagenem, verdünntem und artfremdem Blut kann die Oxydationsvorgänge ungünstig beeinflussen.

Ich habe leider nur in wenigen Versuchen Hundeleber mit Hundeblut durchströmen können.

In den meisten Versuchen habe ich Kaninchenleber und defibriniertes unverdünntes Kalbsblut verwendet, da es nicht möglich war, das arteigene Blut in genügender Menge zu beschaffen. Die Ergebnisse von mit artfremden Blut ausgeführten Versuchen bedürfen, wenn sie negativ ausfallen, der Kontrolle durch solche mit arteigenem Blut. Wo jedoch Stoffwechselvorgänge trotz artfremden Blutes zustande kommen, dürften die Ergebnisse eher a fortiori beweisend sein.

3. Es gelingt öfter nicht, eine gleichmäßige genügende Zirkulation zustande zu bringen. In diesem Falle kann Steigerung des Druckes helfen, doch gelingt dies durchaus nicht immer. In meinen Versuchen betrug bei geeigneter Regulierung die Größe des Blutstromes in kleinen Lebern und bei Durchblutungen, die mit einem Druck von 30 bis 40 ccm Hg durchgeführt wurden, 80, 100, 120, 140 ccm pro Minute, in den ersten Viertelstunden stellten sich noch höhere Werte bis 200 und 300 ccm pro Minute heraus. Es entsprechen diese Zahlen etwa den bei Richet[1]) für den Blutstrom in der Vena portae gemachten Angaben. Der ebendort angegebene Blutdruck von maximal 32 mm Hg ließ sich aber nur in einer sehr beschränkten Zahl von Fällen aufrechterhalten, eine Steigerung wenigstens bis auf 50 mm Hg war meistens nicht selten, eine weitere Steigerung, gelegentlich bis 160 mm, notwendig.

Die Versuche mit arteigenem Blut verliefen in dieser Hinsicht meist günstiger als die mit artfremdem. Aber weder die Benutzung artfremden noch die des von uns stets verwendeten unverdünnten Blutes sind ausschließlich für das nicht seltene Fehlschlagen der Versuche verantwortlich zu machen.

Sicherlich hat man oft eine Embolisierung einzelner oder mehrerer Pfortaderstämme anzunehmen. Bei der Sektion der Organe und auch in einzelnen histologischen Untersuchungen fanden sich aber nur selten entsprechende Befunde, die Hauptstämme waren bei den nach etwa 1 Stunde eintretenden Störungen kaum jemals embolisiert.

Öfter läßt sich auch eine partielle Ausschaltung einzelner Leberteile schon während des Versuches sehr wahrscheinlich machen. Fällt ein einzelner Leberlappen vollständig aus, so erweist die Sektion in

---

[1]) Dictionnaire de Physiologie 6.

diesen Partien eine weiche matschige Beschaffenheit gegenüber den prall sich anfühlenden durchbluteten Teilen.

Die nicht oder schwach durchbluteten Lappen schoppen sich trotzdem mit Blut an, was das Gewicht des Organs merklich erhöht, während diese Partien doch an der CO_2-Bildung und Abgabe nur geringen Anteil haben. Die CO_2-Zahl wird so heruntergedrückt.

In einigen Fällen, wo die Durchleitung besondere Schwierigkeiten bot, ergab die histologische Untersuchung starke zylindrische Blutergüsse im periportalen Bindegewebe.

Immer ist nach den mit stärkerem Druck, 100 bis 120 mm Hg, durchgeführten Durchblutungen das histologische Bild der Leber mehr oder weniger stark verzerrt, zwischen den Leberzellreihen finden sich fast überall blutgefüllte Capillaren, deren Weite das drei- und mehrfache der Größe der Leberzellen erreicht. Auffallend war ferner an normal fixierten paraffin-eingebetteten Schnitten die Verschiedenheit in der Größe der Leberzellen untereinander, und parenchymatöse Veränderungen.

Öfter ließ sich die Ursache der Durchströmungsschwierigkeiten nicht ermitteln. So zwang eine in die Hitzeperiode des Jahres 1911 fallende Reihe von Fehlversuchen geradezu zum vorzeitigen Abbruch.

4. Die Sauerstoffzufuhr und Kohlensäureabfuhr kann ungenügend sein.

Diese Fehlerquelle dürfte bei Verwendung unseres Arterialisators kaum je in Betracht gekommen sein. Zu erwähnen ist, daß infolge der guten Durchlüftung Leber und Blut am Schlusse des Versuchs regelmäßig weniger Kohlensäure enthielt als im Beginn.

5. Da bei den Durchströmungsversuchen dasselbe Blut wiederholt das Organ passiert, so kann es darin allmählich zu einer Anhäufung von nicht flüchtigen Stoffwechselprodukten kommen. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Produkte bei zunehmender Konzentration schließlich die Stoffwechselvorgänge beeinflussen. Doch dürfte sich dieser Umstand gerade bei meinen Versuchen kaum in störender Weise geltend gemacht haben, da die aufgewendete große Blutmenge (2 l auf ca. 80 g Organ) einem Ansteigen dieser Produkte zu hohen Konzentrationen nicht günstig war.

6. Bei künstlicher Durchströmung fehlen dem Blute jene Produkte anderer Organe (Nährstoffe, Hormone, Fermente), die im lebenden Tiere von verschiedenster Seite dem Blute zuströmen. Möglicherweise liegt hier eine Fehlerquelle für die Nachahmung bestimmter Funktionen, doch liegt darüber nichts Näheres vor.

7. Es kann zu Bakterienentwicklung kommen und bei langdauernden Versuchen kann diese durch Auftreten von Stoffwechselprodukten zu Täuschungen führen. Zur Vermeidung dieses Übelstandes ist die Säuberung und Desinfektion des Durchblutungsapparates dringend rätlich. Ich benutzte schließlich Antiformin mit folgendem gründlichstem Durchspülen. Daß nur frisches und sauber geschlagenes Blut zu verwenden ist, versteht sich von selbst.

Die Gefahr der Bakterienentwicklung habe ich in einigen absichtlich länger ausgedehnten Versuchen näher kontrolliert.

Die Ergebnisse sind lehrreich genug, um mitgeteilt zu werden. 1. Versuchsdauer 2 Stunden: Bakterien 2 bis 12 im Gesichtsfeld bei Vergrößerung 1:1000. 2. Versuchsdauer 3 Stunden: Zahlreiche Bakterien im Gesichtsfeld. 3. Versuchsdauer 4 Stunden: Im Aufstrichpräparat massenhafte Bakterien. Eine mit dem Blut dieses Versuches angestellte Gärungsprobe zeigt geringe, Blut- + 5%ige Glucoselösung starke Gasentwicklung. Das gebildete Gas ist in beiden Fällen zum überwiegenden Teil durch konzentrierte Natronlauge nicht absorbierbar. In den späteren Stunden nimmt die Bakterienzahl ungeheuerliche Dimensionen an, auf histologischen Präparaten derartiger Lebern finden sich Anhäufungen der Bakterien vor allem in den Lymphräumen.

Die über 4 Stunden ausgedehnten Versuche zeigten meist Hämolyse, mehrmals konnte das Auftreten eines Methämoglobinspektrums im Blut und in der Galle festgestellt werden.

In bezug auf die Technik der Operation nur wenige Bemerkungen. Die Verwendung der Hundeleber bietet der Kaninchenleber gegenüber den Vorteil, daß die Präparation leichter ist und die Gefäße einen höheren Druck vertragen, ohne zu platzen. Auch können die sich zuweilen an der Leberoberfläche findenden Varicenbildungen bei höherem Druck die Ursache zu Blutungen sein. Trotz dieser Mängel haben wir aus äußeren Gründen besonders zu Reihenversuchen Kaninchen mit Vorliebe benutzt.

Um die Menge der im Organ entstehenden Kohlensäure beurteilen zu können, ist es erforderlich, die Kohlensäuremenge zu kennen, die unter gleichen Verhältnissen im Durchblutungsblut an sich gebildet war.

Ich habe darum in einer Anzahl von Vorversuchen diese Größe bestimmt, indem ich das Blut allein unter ganz gleichen Bedingungen wie beim Leberversuch durch den Apparat trieb. Eine Spirale von Capillarschlauch, die in dem auf 40° ge-

brachten Rezipienten untergebracht war, vertrat dabei die Leber. Die ermittelten Werte sind aus nachstehender Tabelle zu entnehmen.

Tabelle I.

Versuche zur Bestimmung der vom Blut allein unter normalen Versuchsbedingungen in dem verwendeten Apparat gebildeten CO_2.

Versuch	Tier	Zeit Std.	Blutmenge ccm	Bl_v CO_2-Gehalt d. Blutes vorher in 50 ccm mg	Bl_n Blut nachher in 50 ccm mg	*Khs* mg	Khs_n mg	$(Bl_n + Khs + Khs_n) - Bl_v$ mg	CO_2 pro 1 kg und Minute g
1	Kalb	2	2000	49,8	39,6	477,0	150,5	169,5	0,0007054
2	„	2	2000	39,6	25,2	519,0	130,05	123,65	0,0005201
3	„	2	2000	48,8	31,2	664,0	127,3	287,3	0,00119708
4	Rind	2	2000	36,6	24,6	687,0	160,8	367,8	0,0013260
5	„	2	2000	41,4	31,8	750,0	127,3	493,3	0,0020503
6	„	2	2000	50,4	32,4	877,0	160,8	317,8	0,0013241
7	Kalb	2	1900	44,4	31,1	605,0	87,1	144,9	0,0006183
8	Hund	2	1750	42,6	22,8	867,0	208,0	382,5	0,0018213
9	Kalb	2	2000	54,6	37,2	886,0	268,0	458,0	0,0019008

Im Mittel: 0,0012735 g CO_2 pro 1 kg u. Min.

Wie man sieht, unterliegt die Kohlensäurebildung im Blute ziemlich großen Schwankungen. Bei der Berechnung der später mitzuteilenden Versuche habe ich den Mittelwert 1,2735 mg pro Liter Blut und Minute zugrunde gelegt. Da die in dem Hauptversuch sich ergebenden Kohlensäurewerte sehr viel höher sind, so kommt die diesem Mittelwert anhaftende Unsicherheit nicht weiter in Betracht.

II. Normalversuche.

Um beurteilen zu können, ob der Zusatz von oxydablen Stoffen die Kohlensäurebildung der Leber erhöht, bedarf es der Kenntnis der unter sonst gleichen Bedingungen erhältlichen Normalwerte. Da es nicht angeht, in jedem einzelnen Versuch die Größe der Kohlensäurebildung in der zum Versuch dienenden Leber zu bestimmen, mußte ich mich mit der Ermittlung eines Mittelwertes begnügen. Zunächst war es erforderlich, den CO_2-Gehalt der Leber selbst vor dem Versuch zu bestimmen.

Tabelle II.

Versuche zur Bestimmung der in der frischen Leber vorhandenen CO_2.

Versuch	Tier	Gewicht g	Lebergewicht g	CO_2 mg	CO_2 pro 1 kg g
1	Kaninchen	2150	60	50,5	0,8416
2	„	1550	40	34,1	0,8525
3	„	1450	41	47,2	1,1540
4	„	1550	50	28,4	0,5680
5	„	850	19	20,8	1,0942
6	„	1530	59	41,1	1,0403
7	„	780	20	22,8	1,1400
8	„	3060	64	53,2	0,8312
			2 Proben zu 50 g:		
9	Hund	5320	309	I 42,84 II 42,00	0,8484

Im Mittel: 0,9268 g CO_2 pro 1 kg Leber

Danach enthält die Leber des Kaninchens (und Hundes) im Mittel 0,9268 g CO_2 pro 1 kg Leber.

Hierauf bestimmte ich unter Zugrundelegung dieser Mittelwerte den Normalwert der Kohlensäurebildung für die Kaninchenleber.

Wie man sieht, schwankt die Kohlensäurebildung pro Minute und Kilogramm von 54,74 bis 192,48 mg. Der Mittelwert stellt sich auf 96,0634.

Danach ist die Kohlensäurebildung in der durchbluteten Leber merklich höher, als nach den Versuchen mit Leberbrei zu schließen war. Battelli und Stern[1]) finden für Hundeleberbrei bei Verwendung von arteigenem Blut in Versuch 3 und 4 207, in Versuch 16 136 ccm CO_2 pro 100° entsprechend 68,2 und 45 mg CO_2 meiner Berechnungsweise. Vermutlich sind ihre Zahlen noch etwas zu hoch, da sie in ihren Versuchen, die durch postmortale Säurebildung bedingte Kohlensäureabgabe nicht berücksichtigen. Für Kaninchenleber + Kaninchenblut findet Lussana[2]) 6,1 bis 6,7 ccm CO_2 pro Stunde und 10 g Leber, was 20,1 bis 22,1 mg CO_2 pro Minute und 1000 g entspricht.

[1]) Journ. de Physiol. et de Pathol. 1907, 412.

[2]) Arch. di Fisiol. 8, 240, 1910.



Tabelle III.

Normalversuche.

Versuchsnummer	Dauer des Versuchs Min.	Lebergewicht vor Versuch g	Lebergewicht nach Versuch g	Blutmenge ccm	CO_2 in Milligramm: in 50 ccm Blut vor Versuch	CO_2 in Milligramm: im Gesamtblut vor Versuch. Bl_v	CO_2 in Milligramm: in 50 ccm Blut nach Versuch	CO_2 in Milligramm: im Gesamtblut nach Versuch. Bl_n	CO_2 in Milligramm: in 50 g Leber nach Versuch	CO_2 in Milligramm: aus der Leber verloren während des Versuches. $Org_n - Org_v$	Zeit zw. I. u. II. Blut CO_2-Bestg. zur Bestg. der CO_2-Bildung im Blut allein in Min.	CO_2 in Milligramm: vom Blut allein gebildet. Bl_b	CO_2 in Milligramm: vor Beginn d. Versuches aus dem Apparat abgegeben. Khs_v	CO_2 in Milligramm: während des Versuches aus dem Apparat abgegeben. Khs	CO_2 in Milligramm: nach dem Abschluß des Versuches im Apparat zurückgeblieben. Khs_n	CO_2 in Milligramm: von der Organoberfläche abgegeben. Khs_p	$[Khs_v + Khs + Khs_n + Khs_p + Bl_n] - [Bl_v + Bl_b + (Org_n - Org_v)]$ g	CO_2 gebildet von 1 kg Leber pro Minute mg
1	120	208,3	253,3	2000	48,4	1946,0	43,9	1756,0	34,8	— 56,30	150	382,10	146,0	1247,0	463,00	140,0	1,36840	54,740
2	105	74,2	86,0	2000	45,6	1824,0	33,3	1332,0	32,2	— 21,24	140	356,60	195,0	795,0	260,30	57,5	0,43780	56,190
3	90	193,0	260,0	1700	32,7	1111,8	28,2	958,8	23,6	— 93,94	100	163,00	45,0	815,0	398,60	167,3	1,01596	58,480
4	60	123,8	229,8	1540	27,0	831,6	30,6	942,5	33,0	— 27,94	90	176,50	141,0	400,0	290,00	127,2	0,86466	116,400
5	60	58,9	145,9	1500	32,4	972,0	27,6	828,0	33,0	— 6,22	90	171,90	146,0	736,0	90,80	30,4	0,68138	192,480
6	120	76,0	106,0	2000	51,0	2040,0	36,0	1440,0	32,4	— 23,50	150	382,10	163,0	1045,0	288,10	87,6	0,57810	63,360
7	120	203,8	390,8	2000	31,8	1272,0	31,2	1248,0	34,2	— 38,30	145	369,30	223,0	1557,0	589,60	146,0	2,08400	85,120
8	90	118,3	173,3	1750	53,0	1855,0	34,2	1197,0	30,0	— 43,28	180	355,14	307,0	1048,0	350,97	120,0	0,76960	72,375
9	75	81,4	99,4	2000	43,1	1724,0	31,2	1248,0	34,2	— 18,68	75	169,10	181,0	710,0	371,58	57,0	0,75606	123,830
10	165	85,0	199,0	1850	43,8	1610,6	22,2	821,4	19,2	— 52,97	165	344,12	165,0	1436,0	304,80	127,0	0,84649	60,285
11	30	67,0	87,0	2000	48,0	1920,0	34,2	1368,0	31,8	— 20,44	30	67,64	226,0	268,0	291,45	36,4	0,18176	90,432
12	120	95,8	134,8	2000	43,8	1752,0	30,0	1200,0	28,8	— 34,54	120	270,56	188,0	1206,0	375,20	80,0	0,99209	86,290
13	120	85,0	109,0	2000	46,8	1872,0	28,2	1128,0	26,4	— 34,76	120	270,56	229,0	1483,0	559,45	81,0	1,30412	127,800
14	115	67,0	123,0	2000	46,8	1872,0	29,6	1184,0	28,2	— 25,98	120	270,56	266,0	1295,0	455,60	178,6	1,21064	157,100
																		1344,882
																		: 14 =
																		96,0634

Da zurzeit anscheinend keine Zahlen über die Kohlensäurebildung in der Leber während des Lebens des Tieres vorliegen[1]), ist es nicht möglich durch direkte Vergleiche Schlüsse darüber zu ziehen, inwieweit der Gaswechsel der durchströmten Leber von der physiologischen Größe abweicht. Indes zeigt ein Vergleich mit den an anderen Organen[2]) erhaltenen Normalwerten, daß es sich um Werte von gleicher Größenordnung handelt.

	CO_2 pro 1 kg und Minute mg
Junges Hundeherz gibt im Mittel	91,802
„ Katzenherz „ „ „	66,980
Hundeniere „ „ „	77,100
„ bei Diurese durch NaCl oder $\overset{+}{\text{Ur}}$ hervorgerufen	90,95—219,5

Die Leber steht danach in ihrer Fähigkeit der Kohlensäurebildung etwa mit der Niere auf gleicher Stufe. Auch die Steigerung der CO_2-Bildung durch Zuführung von oxydablen Stoffen (s. u.) bewegt sich in ganz ähnlichen Größen wie die bei der Niere durch Diuretica erzielbare Steigerung.

III. Versuche mit Zusatz von oxydablen Substanzen.

Meine Versuche beschränkten sich auf Traubenzucker, Galaktose, Brenztraubensäure, Glycerinsäure, Milchsäure, Glyoxylsäure, Glykolsäure, Essigsäure und Glykokoll. (Über die Art der Beibringung ist im methodischen Teil berichtet.)

Die Beurteilung dieser Resultate wird einigermaßen durch die große Verschiedenheit der Normalwerte erschwert. Es besteht keine scharfe Grenze, einzelne Zahlen der Normalversuche reichen in das Gebiet der Versuche mit Zusatz von oxydablen Stoffen. Immerhin sind das nur einzelne Versuche, unter 14

---

[1]) Barcroft und Shore erhielten in einer kürzlich erschienenen Arbeit (Journ. of Physiol. 45, Nr. 4, S. 296) für die Sauerstoffabsorption der Katzenleber (nach 18stündigem Hunger) Werte von 34,32 bis 71,50 mg Sauerstoff pro 1 kg und Minute. Diese Zahlen entfernen sich also nicht weit von den von uns erhaltenen entsprechenden Kohlensäurewerten.

[2]) Barcroft, Ergebn. d. Physiol. 7, 699, 1908 u. ff.

finden sich bloß 5, welche Werte über 100 g, und nur 2, die Werte über 130 g ergeben. Vermutlich handelt es sich in diesen Fällen um Lebern, die leicht angreifbare Vorratsstoffe in größerer als durchschnittlicher Menge enthielten.

Hält man sich an den Durchschnitt der Normalversuche, so darf man wohl jene Zusatzstoffe als Kohlensäurebildner ansehen, die in allen Versuchen über 100 g und in mindestens $^3/_4$ der Versuche über 130 mg CO_2 ergeben haben. Es sind dies: Traubenzucker, Brenztraubensäure, Glycerinsäure, Milchsäure. Hingegen kann Galaktose, Glyoxylsäure, Essigsäure und wohl auch Glykolsäure nicht dazu gezählt werden. Sie boten einfach Normalwerte. Bei der Glykolsäure ist zurzeit ein sicheres Urteil nicht zu fällen, da die Zahl der Einzelversuche nicht groß genug ist. Ich bin mir wohl bewußt, daß diese Statistik nur den Anfang weiterer in gleicher Richtung zu führenden Versuche darstellt und nur mit vieler Vorsicht weitergehende Schlüsse gestattet. Als feststehend darf wohl aber angesehen werden, daß es Stoffe gibt, welche die Kohlensäurebildung — denn um solche handelt es sich, nicht bloß um Kohlensäureabgabe — in der Leber befördern. Wenn ich sie der Bequemlichkeit des Ausdrucks wegen als Kohlensäurebildner bezeichnet habe, soll damit nicht mit Bestimmtheit behauptet sein, daß die Vermehrung der Kohlensäure auf ihren oxydativen Abbau zurückzuführen ist. Allein es bleibt zu bedenken, daß 1000 g Leber über 200 g organische Stoffe enthalten; und so wenig wahrscheinlich das ist, kann daran gedacht werden, daß sonst indifferente Substanzen die Verbrennungsprozesse durch eine Art Reizwirkung steigern. Die Möglichkeit, daß das Plus der Kohlensäure irgendwie aus diesen 200 g organischer Substanz herstammt, läßt sich nun einmal nicht zahlenmäßig widerlegen. Daß es sich um eine direkte Kohlensäurebildung aus den zugeführten Stoffen handelt, wird allerdings dadurch wahrscheinlich, daß es sich, wo Vermehrung der Kohlensäure vorliegt, gerade um Stoffe handelt, deren Verwertbarkeit für den Leberstoffwechsel, z. B. für die Glykogenbildung, sichersteht (Traubenzucker [im Gegensatz zu Galaktose], Glycerinsäure, Milchsäure), oder deren Abbau unter CO_2-Abspaltung verständlich ist (Brenztraubensäure). Indes können nur gehäufte Versuche mit anderen oxydablen Stoffen darüber Entscheidung bringen.

Tabelle IV.

Substanzversuche.

Versuchsnummer	Dauer des Versuchs Min.	Lebergewicht vor Versuch g	Lebergewicht nach Versuch g	Blutmenge ccm	Traubenzucker	CO_2 in Milligramm: in 50 ccm Blut vor Versuch	CO_2 in Milligramm: im Gesamtblut vor Versuch. Bl_v	CO_2 in Milligramm: in 50 ccm Blut nach Versuch	CO_2 in Milligramm: im Gesamtblut nach Versuch. Bl_n	CO_2 in Milligramm: in 50 g Leber n. Versuch	CO_2 in Milligramm: aus der Leber verloren während des Versuchs. $Org_n - Org_v$	Zeit zw. I. u. II. Blut CO_2-Bestg. zur Bestg. der CO_2-Bildung im Blut allein in Min.	CO_2 in Milligramm: vom Blut allein gebildet. Bl_b	CO_2 in Milligramm: vor Beginn d. Versuches aus dem Apparat abgegeben. Khs_v	CO_2 in Milligramm: während des Versuches aus dem Apparat abgegeben. Khs	CO_2 in Milligramm: nach dem Abschluß des Versuches im Apparat zurückgeblieben. Khs_n	CO_2 in Milligramm: von der Organoberfläche abgegeben. Khs_p	$[Khs_v + Khs + Khs_n + Khs_p + Bl_n] - [Bl_v + Bl_b + (Org_n - Org_v)]$ g	CO_2 gebildet von 1 kg Leber pro Minute mg
15	120	62,5	85,5	2000	5,0	42,0	1680,0	26,4	1056,0	25,8	− 25,95	120	270,56	186,0	1131,0	438,85	45,0	1,080330	143,00
16	120	58,0	98,0	2000	5,0	51,0	2040,0	21,6	864,0	23,4	− 25,17	120	270,56	690,0	1634,0	505,85	120,0	0,978115	140,53
17	120	67,0	103,0	2000	4,0	45,0	1800,0	31,2	1248,0	27,6	− 27,70	120	270,56	212,0	1338,0	385,25	70,0	1,154980	143,65
18	80	63,4	89,4	2000	5,0	44,4	1776,0	34,8	1392,0	27,6	− 27,50	80	180,37	168,0	957,0	440,20	34,0	1,007810	198,60
																			625,78 : 4 = 156,445
					Galaktose														
19	120	67,0	109,0	1650	5,0	46,2	1524,6	19,2	633,6	21,6	− 32,13	110	204,61	122,0	1,1030	442,20	99,0	0,63845	79,409
20	105	105,0	177,0	2000	5,0	51,6	2054,0	25,8	1032,0	25,2	− 45,258	105	231,10	183,0	1,5070	458,90	81,0	0,93153	84,490
21	109	58,0	108,0	2000	4,0	50,4	2016,0	26,4	1056,0	24,6	− 27,01	109	245,76	306,0	1,0960	455,60	72,0	0,71681	113,330
																			277,229 = 92,404
					Brenztraubensäure														
22	120	94,2	132,2	2000	4,0 NH_3	56,4	2256,0	29,4	1760,0	27,6	− 36,67	40	90,18	146,0	1,7570	596,30	91,8	1,96823	174,11
23	105	68,8	162,8	2000	5,0 NH_3	57,0	2280,0	33,0	1320,0	41,4	± 18,67	120	270,56	152,0	1,7700	637,50	127,0	1,47460	204,12
24	120	108,5	150,5	1600	4,5 Na	35,4	1132,8	19,8	633,6	21,0	− 53,97	135	243,50	111,0	1,7310	653,20	90,0	1,78850	137,36
25	120	68,8	168,8	2000	4,2 Na	48,6	1944,0	22,8	912,0	25,2	− 18,28	120	270,56	153,0	1,7780	663,30	127,0	1,40040	169,64
																			685,23 = 171,309

					Glycerinsäure														
26	145	71,5	113,5	2000	5,0 NH_3	43,2	1728,0	31,6	1264,0	30,6	− 23,44	145	326,93	300,0	2,0680	489,10	50,9	2,09360	201,94
27	122	67,0	100,0	2000	5,0 NH_3	42,0	1680,0	27,0	1080,0	22,8	− 34,31	122	275,07	138,0	1,0770	649,90	125,0	1,08000	132,20
28	130	73,3	124,3	2000	5,0 NH_3	50,4	2016,0	25,8	1032,0	21,6	− 40,55	155	349,47	199,0	1,8140	582,90	198,0	1,41980	150,06
29	107	50,8	86,8	2000	4,0 NH_3	49,2	1968,0	31,8	1272,0	29,4	− 18,93	107	241,25	174,0	1,0230	358,50	52,0	0,65130	119,80
																			604,00
																			= **150,80**
					Milchsäure														
30	107	73,3	142,3	2000	6,0 NH_3	53,4	2136,0	35,4	1416,0	28,8	− 34,82	107	241,25	290,0	1,5450	442,40	77,0	1,35830	173,18
31	120	87,7	189,7	2000	4,0 NH_3	48,6	1944,0	25,2	1008,0	25,2	− 37,07	120	270,56	273,0	1,5950	452,80	165,0	1,24210	118,03
32	135	80,5	167,5	1650	4,0 NH_3	57,0	1881,0	28,2	930,6	25,2	− 39,25	135	251,11	333,0	1,8230	518,80	90,0	1,52400	141,15
33	63	86,0	104,0	2000	4,5 Na	48,0	1920,0	33,0	1320,0	33,0	− 2,93	60	135,28	142,0	0,8990	552,80	56,0	0,91158	168,25
																			600,61
																			= **150,15**
					Glyoxylsäure														
34	135	76,0	106,0	2000	4,0 Na	43,8	1752,0	28,2	1128,0	29,4	− 24,96	135	304,38	248,0	1,4390	294,80	48,0	1,076400	104,91
35	78	98,5	131,5	2000	4,0 Na	47,4	1896,0	28,8	1152,0	25,8	− 42,44	78	175,86	194,0	928,0	375,20	47,2	0,582090	75,70
36	107	67,0	123,0	2000	5,0 Na	48,0	1920,0	33,0	1320,0	36,0	− 10,49	180	405,84	106,0	1304,0	492,50	72,0	0,958150	133,40
37	120	67,0	144,0	2000	4,0 Na	54,6	2184,0	27,6	1104,0	29,4	− 18,92	140	315,65	94,0	1184,0	338,40	100,0	0,301814	37,53
																			351,62
																			= **87,905**
					Glykolsäure														
38	120	94,0	158,0	1300	4,0 NH_3	45,0	1170,0	24,6	639,6	23,4	− 44,86	120	175,86	227,0	1724,8	384,80	98,0	1,68340	149,24
39	85	76,0	107,0	2000	4,0 NH_3	47,4	1896,0	30,6	1224,0	27,0	− 8,82	85	191,64	121,0	1104,0	428,80	55,0	0,83632	129,46
40	85	62,5	85,5	2000	4,0 Na	53,4	2136,0	34,8	1392,0	33,0	− 17,50	95	214,19	127,0	838,0	335,00	40,0	0,36430	68,50
																			347,20
																			= **115,73**
					Essigsäure														
41	120	98,5	145,5	2000	4,0 NH_3	48,0	1920,0	22,2	888,0	19,2	− 66,40	120	270,56	302,0	1449,0	407,40	60,0	0,84942	71,80
42	120	67,0	102,0	2000	5,0 NH_3	47,4	1896,0	25,8	1032,0	24,6	− 30,91	120	270,56	173,0	1118,0	371,80	79,0	0,57632	71,68
43	120	59,8	108,8	2000	5,0 Na	49,2	1968,0	27,6	1104,0	30,0	− 17,19	120	270,56	177,0	1520,0	355,10	78,0	0,97835	136,33
																			279,81
																			= **93,27**
					Glykokoll														
44	120	202,0	346,0	2000	4,0	43,8	1752,0	33,6	1344,0	29,4	− 64,40	120	270,56	214,0	2235,0	556,00	50,0	2,31203	= **95,38**

Blut allein bildet pro kg/Min. 1,2735 mg CO_2 (Mittel von 9 Versuchen). Leber enthält frisch pro 1 kg 926,8 mg CO_2 (Mittel aus 9 Versuchen). Die angegebenen Gewichte für Leber sind Nettogewichte minus Zwerchfell minus Kanüle. CO_2 von (Org_n — Org_v) wurde so berechnet, daß das darin angeschoppte Blut als gleich Bl_n betrachtet und subtrahiert wurde.

Daß der Abbau dieser Verbindungen in der Leber nicht über Glyoxyl- und Essigsäure geht, ist nach dem indifferenten Verhalten dieser Säuren anzunehmen. Da nach Pohl auch Oxalsäure und Ameisensäure als direkte CO_2-Vorstufen ausscheiden, ergibt sich für die CO_2-Bildung aus Fettkörpern in der Leber, daß hier, bevor es zur Bildung dieser einfachen Verbindungen kommt, Reaktionen eintreten, die den Oxydationsvorgang nach einer anderen Richtung lenken, als wir auf Grund der einfach chemischen Vorgänge sonst anzunehmen geneigt sind.

IV. Über den zeitlichen Verlauf der CO_2-Bildung nach Zufuhr von CO_2-Bildnern.

Im ersten Stadium unserer Versuche haben wir nicht, wie oben beschrieben, die absolute Menge der Kohlensäure bestimmt, sondern untersucht, ob nach Zugabe einer Substanz die CO_2-Kurve, in Viertelstunden gemessen, steigt oder nicht. Diese in der Ausführung viel bequemere Methode wurde verlassen, weil sie bei einer beschränkten Zahl von Versuchen für eine Substanz zu ungleichmäßige Resultate ergab und weil die Kenntnis der absoluten Werte der produzierten Kohlensäure von größerer Brauchbarkeit erschien.

Trotzdem sollen einige Versuche dieser Art mitgeteilt werden, weil es gelegentlich von Wert sein kann, den zeitlichen Verlauf der CO_2-Abspaltung bestimmter Substanzen zu untersuchen.

Nun erweist sich unser Apparat für eine derartige Bestimmung hauptsächlich wegen seiner Größe zu wenig empfindlich. Die Schwankungen im Kohlensäuregehalt des Organs und des Blutes kommen darin — ähnlich wie in der Lungenluft des lebenden Tieres — verspätet und abgeschwächt zur Geltung. Wird eine oxydable Substanz, z. B. Traubenzucker, dem zuströmenden Blute beigemengt, so braucht es erst eine gewisse Zeit, daß sie die Leber erreicht und in dieser sich annähernd gleichmäßig verteilt. Während dieser Periode steigt die Kohlensäurebildung allmählich, aber diese Vermehrung kommt auch nur allmählich in den Absorptionsgefäßen zur Wahrnehmung, da das abfließende kohlensäurereichere Blut erst den Weg zum Arterialisator machen muß, und hier die abgegebene Kohlensäure in dem relativ großen Gasvolumen

zunächst nur eine geringe Steigerung veranlassen kann. Umgekehrt bedarf nach Absinken der gesteigerten Kohlensäurebildung in der Leber das gebildete Kohlensäure-Plus einer gewissen Zeit, bevor es seiner ganzen Menge nach zu den Absorptionsgefäßen gelangt.

Um über diese Verhältnisse ins klare zu kommen, habe ich in einer Anzahl von Versuchen eine gemessene Menge mit CO_2 gesättigten Blutes zugesetzt und die dann eintretende Veränderung der Kohlensäureabgabe festgestellt.

Auf Grund dieser für den angewandten Apparat gültigen Verhältnisse läßt sich dann das Resultat der Versuche beurteilen, in denen nach Zusatz von oxydablen Stoffen der zeitliche Verlauf der Kohlensäureabgabe verfolgt wurde.

Die Ausführung eines derartigen Versuches verlief so, daß man nach Einfügen des Organs zunächst $^1/_2$ bis 1 Stunde eine Normalkurve schreiben ließ und dann die betreffende Substanz zufügte.

Die CO_2-Ausschwemmung im Apparat aus Blut allein gestaltet sich demnach z. B. folgendermaßen:

2000 ccm Kalbsblut bei 37 bis 40°, mittlerer Blutstrom ca. 120 ccm pro Minute. Sauerstoff durch den Apparat gesandt 3,20 bis 3,25 l pro $^1/_4$ Stunde. Man erhält dann CO_2

in der ersten $^1/_4$ Stunde	0,0636 g
„ „ zweiten „	0,0792 g
„ „ dritten „	0,0824 g
„ „ vierten „	0,0824 g
„ „ fünften „	0,0888 g
„ „ sechsten „	0,0936 g
„ „ siebenten „	0,0824 g
„ „ achten „	0,0924 g

Bei Einsetzen des Organs und späterem Zufügen von kohlensäuregesättigtem Blut ergibt sich folgender Verlauf:

1500 ccm Kälberblut bei 38 bis 40°, Blutstrom gleichmäßig ca. 140 ccm pro Minute, Sauerstoff 3,0 bis 3,1 l pro $^1/_4$ Stunde.

Erste $^1/_4$ Stunde Blut allein	0,0876 g
zweite „ „ „	0,0904 g
dritte „ „ „	0,0912 g

Leber 119 g von Kaninchen, 3850 g schwer, eingefügt:

Vierte 1/4 Stunde	. . . .	0,1140 g
fünfte "	. . . .	0,1476 g
sechste "	. . . .	0,1580 g

50 ccm CO_2-gesättigtes Blut in die Vena portae eingeführt:

Siebente 1/4 Stunde	. . . .	0,2864 g
achte "	. . . .	0,2352 g
neunte "	. . . .	0,2436 g
zehnte "	. . . .	0,2028 g

Die Durchblutung der Leber allein gibt z. B. folgenden Verlauf:

Kaninchen 4 kg, Leber 115 g. Temperatur 38,5 bis 39,5°. Blutdruck 30 bis 60 mm Hg. Sauerstoff 3,05 bis 3,15 l pro 1/4 Stunde.

Erste 1/4 Stunde	. . . . . .	0,0864 g
zweite "	. . . . . .	0,1056 g
dritte "	. . . . . .	0,1104 g
vierte "	. . . . . .	0,1140 g
fünfte "	. . . . . .	0,1200 g
sechste "	. . . . . .	0,1248 g
siebente "	. . . . . .	0,1320 g
achte "	. . . . . .	0,1344 g

Zwei Versuche unter sonst gleichen Bedingungen gestalteten sich nach Zugabe von glycerinsaurem Ammoniak (4,0 g Glycerinsäure mit NH_3 bis zur amphoteren Reaktion genau neutralisiert) folgendermaßen:

Versuch 1.

Erste 1/4 Stunde	. . . . . .	0,1140 g
zweite "	. . . . . .	0,1368 g
dritte "	. . . . . .	0,1500 g
vierte "	. . . . . .	0,1524 g
fünfte "	. . . . . .	0,1534 g

Zugabe von Ammonglycerinat:

Sechste 1/4 Stunde	. . . . . .	0,2004 g
siebente "	. . . . . .	0,2214 g
achte "	. . . . . .	0,2052 g
neunte "	. . . . . .	0,2040 g

Versuch 2.

Erste 1/4 Stunde	......	0,0960 g
zweite "	......	0,1200 g
dritte "	......	0,1320 g
vierte "	......	0,1452 g
fünfte "	......	0,1540 g

3,5 Acid. glycerin., mit NH_3 genau neutralisiert, in 25 ccm H_2O zugeführt:

Sechste 1/4 Stunde	......	0,2172 g
siebente "	......	0,2568 g
achte "	......	0,2424 g
neunte "	......	0,2414 g
zehnte "	......	0,2460 g

Ähnliche Resultate ergaben sich bei Brenztraubensäure.

Versuch 1.

Erste 1/4 Stunde	......	0,0760 g
zweite "	......	0,0960 g
dritte "	......	0,1070 g
vierte "	......	0,1110 g
fünfte "	......	0,1160 g

4,0 Brenztraubensäure, mit NH_3 neutralisiert, zugeführt:

Sechste 1/4 Stunde	......	0,1420 g
siebente "	......	0,1930 g
achte "	......	0,1760 g
neunte "	......	0,1660 g
zehnte "	......	0,1780 g

Versuch 2.

Erste 1/4 Stunde	......	0,1220 g
zweite "	......	0,1540 g
dritte "	......	0,1520 g
vierte "	......	0,1510 g

6,5 g Brenztraubensäure, mit NH_3 neutralisiert:

Fünfte 1/4 Stunde	......	0,1700 g
sechste "	......	0,2500 g
siebente "	......	0,2660 g
achte "	......	0,2610 g
neunte "	......	0,2710 g
zehnte "	......	0,3080 g

Die Ergebnisse dieser Versuche stehen mit dem früher Gesagten in gutem Einklang. Aber eine Bestimmung der Angreifbarkeit einer Substanz durch ihre Kohlensäurekurve erweist sich als untunlich, weshalb ich von der Wiedergabe weiterer Versuche absehe. Für bestimmte Zwecke wäre das Verfahren immerhin von Wert, namentlich wenn es gelänge, den Durchblutungsapparat durch Verkleinerung des Blutvolumen und des Arterialisators eine Gestalt zu geben, die eine promptere Registrierung der Kohlensäurebildung ermöglichte.

Zusammenfassung.

1. Bei künstlicher Durchblutung der Kaninchen- (und Hunde-)Leber mit Kalbsblut resp. Rindsblut bildet diese 54,74 bis 192,48 mg CO_2 pro Kilogramm in der Minute. Der Mittelwert stellt sich auf 96,06 mg.

2. Zusatz von Traubenzucker, Brenztraubensäure, Glycerinsäure und Milchsäure steigerte die Kohlensäurebildung um ca. 50%. Hingegen hatten Galaktose, Glyoxylsäure, Glykolsäure und Essigsäure keinen derartigen Einfluß.

Die vorliegenden Untersuchungen sind mit Beihilfe einer von der Cunitz-Stiftung gewährten Subvention ausgeführt.

Protokolle.

Normalversuche.

Versuch 1.

Hund: 6372 g. Blutdruck: 40 bis 75 mm Hg. Bluttemperatur: 36,5° bis 38°. Blutart: Rind. Blutstrom: gleichmäßig gut, ca. 120 bis 140 ccm pro Minute. Sauerstoff durch den Apparat gesandt 3,1 bis 3,15 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: Verlauf ohne Störung.

Versuch 2.

Kaninchen: 3900 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 90 mm Hg. Blutstrom: gleichmäßig, ca. 100 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38° bis 39°. Sauerstoff durch den Apparat gesandt 3,0 bis 3,15 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: Verlauf ohne Störung.

Versuch 3.

Hund: 5580 g. Blutart: Hund. Blutdruck: 40 mm Hg. Blutstrom: gut, ca. 120 bis 140 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0° bis 38,5°. Gebr. Sauerstoff: 3,05 bis 3,15 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: Organ blutet, die dabei entweichende CO_2 wird als Perspirations-CO_2 mit aufgefangen.

Versuch 4.

Junger Hund: 3060 g. Blutart: Hund. Blutdruck: in den ersten 30 Minuten 40 mm Hg, dann langsam gesteigert auf 100 mm Hg in der letzten Viertelstunde. Blutstrom: normal. Bluttemperatur: 37,0°. Sauerstoff: 3,05 bis 3,2 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: Organ blutet, deswegen vorzeitiger Abbruch des Versuchs.

Versuch 5.

Junger Hund: 1860 g. Blutart: Hund. Blutdruck: 40 mm Hg, am Schluß 80 mm Hg. Blutstrom: normal. Bluttemperatur: 37,0° bis 38,5°. Sauerstoff: 3,1 bis 3,15 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: Abbruch des Versuchs wegen Organblutung.

Versuch 6.

Kaninchen (ca. 2 bis 3 Jahre alt): 3810 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 38 bis 40 mm Hg. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,5°. Blutstrom: ca. 80 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,2 bis 3,65 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: ungestörter Verlauf.

Versuch 7.

Hund (ca. 1 Jahr alt): 6480 g. Blutart: Hund. Blutdruck: 40 bis 60 mm Hg. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,0°. Blutstrom: 100 bis 120 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,0 bis 3,4 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: in der letzten halben Stunde mäßige Blutung des Organs.

Versuch 8.

Kaninchen: 3710 g. Blutart: Kalbsblut. Blutdruck: 1. Viertelstunde 40, 2. Viertelstunde 44, 3. Viertelstunde 60, 4. Viertelstunde 80 bis 100 mm Hg. Blutstrom: 1. Viertelstunde gut, dann nachlassend, aber im Trabe ca. 60 bis 100 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,5°. Sauerstoff: 3,3 bis 4,05 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: Blutung aus Organ.

Versuch 9.

Kaninchen: 4000 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 80 mm Hg. Bluttemperatur: 38,0° bis 38,5°. Blutstrom: ca. 100 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,0 bis 3,15 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: normaler Verlauf.

Versuch 10.

Kaninchen: 3200 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 45 Minuten 40 bis 50 mm Hg, 30 Minuten 80 bis 100 mm Hg. Bluttemperatur: 38,5° bis 39,0°, Blutstrom: anfangs (30 Minuten) stark, dann ca. 80 ccm pro Minute. Sauerstoff: 2,5 bis 3,2 l pro 15 Minuten.

Versuch 11.

Kaninchen: 4100 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 55 mm Hg. Bluttemperatur: 37,0° bis 38,5°. Blutstrom: 100 bis 140 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,1 bis 3,6 l pro 15 Minuten.

Versuch 12.

Kaninchen: hungert 48 Stunden[1]), dann Gewicht 3450 g. Blutart: Kalbsblut. Blutdruck: 40 bis 50 mm Hg. Bluttemperatur: 39°. Blutstrom: 86 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,1 bis 3,25 l pro 15 Minuten.

Versuch 13.

Kaninchen: hungert 72 Stunden, dann Gewicht 4050 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: $^3/_4$ Stunde 40, dann Steigerung bis 90 mm Hg. Bluttemperatur: 38,5°. Blutstrom: ca. 110 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,1 bis 3,2 l pro 15 Minuten. Bemerkung: normaler Verlauf.

Versuch 14.

Kaninchen: hungert 48 Stunden, dann Gewicht 3351 g. Blutdruck: 38 bis 80 mm Hg. Bluttemperatur: 38,5° bis 39,0°. Blutstrom: ca. 110 ccm pro Minute. Sauerstoff: 2,5 bis 3,75 l pro 15 Minuten. Bemerkungen: normale Durchblutung.

Versuch 15.

Kaninchen: hungert 72 Stunden, dann Gewicht 3100 g. Blutdruck: 60 bis 70 mm Hg. Bluttemperatur: 38,5°. Blutstrom: gleichmäßig, 80 ccm pro Minute. Sauerstoff: 2,2 bis 3,25 l pro 15 Minuten. Bemerkung: geringe Blutung am Organ.

Substanzversuche.

Versuch 1.

(Traubenzucker.)

Kaninchen: 3150 g, nach 72 Stunden Hunger 2950 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 110 mm Hg. Bluttemperatur: 35,5° bis 37,5°. Blutstrom: unregelmäßig, zuweilen tropfend, durchschnittlich ca. 60 ccm pro Minute. Sauerstoff: 2,7 bis 3,5 l pro 15 Minuten.

Versuch 2.

(Traubenzucker.)

Kaninchen: 3200 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 75 Minuten 40 bis 60, dann allmähliche Steigerung bis 100 mm Hg. Blutstrom: unregelmäßig, ca. 70 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37,5° bis 39,5°. Sauerstoff: 2,6 bis 3,1 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Abgesehen von Unregelmäßigkeiten im Blutstrom, normaler Verlauf.

Versuch 3.

(Traubenzucker.)

Kaninchen: 3075 g, nach 48 Stunden Hunger 3000 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 50 bis 100 mm Hg. Blutstrom: ca. 75 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 36° bis 38°. Sauerstoff: 3,0 bis 4,1 l pro 15 Minuten.

---

[1]) Die Hungertiere bekamen nur Wasser nach Belieben.

Versuch 4.

(Traubenzucker.)

Kaninchen: 3800 g, nach 4 Tagen Hunger 3420 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 60 bis 120 mm Hg. Bluttemperatur: 38°. Blutstrom: mäßig. Sauerstoff: 3 l pro 15 Minuten.

Versuch 5.

(Galaktose.)

Kaninchen: 3200 g, nach 3 Tagen Hunger 2900 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 50 mm Hg. Bluttemperatur: 36,0° bis 38,5°. Blutstrom: gut, durchschnittlich 120 ccm pro Minute. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten.

Versuch 6.

(Galaktose.)

Kaninchen: 3200 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 140 mm Hg. Blutstrom: anfangs ca. 54 ccm pro Minute, später nur tropfend. Bluttemperatur: 36,5° bis 37,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten. Bemerkung: vorzeitiger Abbruch des Versuchs wegen ungenügenden Blutstromes.

Versuch 7.

(Galaktose.)

Kaninchen: 2650 g, nach 3 Tagen Hunger 2410 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 160 mm Hg. Blutstrom: ca. 60 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37,0° bis 38,5°. Sauerstoff: 3 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Abbruch des Versuchs wegen Gefäßbruches.

Versuch 8.

(Brenztraubensäure.)

Kaninchen: 3210 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 70 mm Hg. Blutstrom: gleichmäßig gut, bis zu 200 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37,0° bis 39,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten.

Versuch 9.

(Brenztraubensäure.)

Kaninchen: 3190 g, nach 3 Tagen Hunger 2900 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 50 bis 80 mm Hg. Blutstrom: 120 bis 150 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37° bis 38,5°. Sauerstoff: 3,0 bis 3,25 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Blut nach Schluß des Versuches lackfarbig (Ursache?).

Versuch 10.

(Brenztraubensäure.)

Kaninchen: 3500 g, nach 2 Tagen Hunger 3400 g. Blutart: Kalb. Blutdruck 40 bis 70 mm Hg. Blutstrom: gleichmäßig, ca. 100 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,0°. Sauerstoff: 3 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Blut am Schlusse des Versuches lackfarbig.

Versuch 11.

(Brenztraubensäure.)

Kaninchen: 3000 g, nach 3 Tagen Hunger 2800 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 70 mm Hg. Blutstrom: gleichmäßig, ca. 100 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37,5° bis 38,5°. Sauerstoff: 3,0 bis 3,1 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Bruch eines Ohrflächengefäßes, Blut aufgefangen und zurückgepumpt. In der zweiten Hälfte des Versuches deutlich einsetzendes Lackigwerden des Blutes.

Versuch 12.

(Glycerinsäure.)

Kaninchen: 3750 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 38 bis 50 mg Hg Bluttemperatur: 37,0° bis 38,0°. Sauerstoff: 3,2 bis 5,0 l pro 15 Minuten. Bemerkung: In den ersten 25 Minuten des Versuches infolge Undichtigkeit des Apparates CO_2-Verluste, die für diese Zeit eingesetzten CO_2-Zahlen wurden aus den nächsten 15 Minuten berechnet.

Versuch 13.

(Glycerinsäure.)

Kaninchen: 3110 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 120 mm Hg. Blutstrom: schwach laufend bis schnell tropfend, durchschnittlich 40 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 36,0° bis 37,0°. Sauerstoff: 3,1 bis 3,6 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Mangelhafte Blutdurchströmung.

Versuch 14.

(Glycerinsäure.)

Kaninchen: 2900 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 90 mm Hg. Blutstrom: ca. 125 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37,5° bis 39,0°. Sauerstoff: 3,1 bis 3,3 l pro 15 Minuten.

Versuch 15.

(Glycerinsäure.)

Kaninchen: 3 Tage Hunger, dann 2 Tage gefüttert, dann 4 Tage Hunger, Endgewicht: 2500 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 100 mm Hg. Blutstrom: in der ersten Hälfte des Versuchs gut, ca. 100 ccm pro Minute, dann schlechter werdend. Bluttemperatur: 37,0° bis 38,5°. Sauerstoff: 2,85 bis 3,05 l pro 15 Minuten.

Versuch 16.

(Milchsäure.)

Kaninchen: 3300 g, nach 4 Tagen Hunger 3060 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 100 mm Hg. Blutstrom: mäßig, ca. 45 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Abbruch wegen Gefäßbruches. Blut am Schlusse etwas lackfarben.

Versuch 17.
(Milchsäure.)

Kaninchen: 3800 g, nach 3 Tagen Hunger 3500 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 50 mm Hg. Blutstrom: 67 ccm pro Minute, am Schlusse langsamer. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Blutung aus oberflächlichem Lebergefäße.

Versuch 18.
(Milchsäure.)

Kaninchen: 3250 g, nach 3 Tagen Hunger 3000 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 70 mm Hg. Blutstrom: gleichmäßig, ca. 84 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,0°. Sauerstoff: 3,0 bis 3,15 l pro 15 Minuten.

Versuch 19.
(Milchsäure.)

Kaninchen: 3150 g, nach 3 Hungertagen 2950 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 70 mm Hg. Blutstrom: mäßig laufend und tropfend, durchschnittlich ca. 50 bis 60 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 37,0° bis 38,0°. Sauerstoff: 3,0 bis 3,05 l pro 15 Minuten.

Versuch 20.
(Glyoxylsäure.)

Kaninchen: nach 4 Tagen Hunger 3010 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 90 mm Hg. Blutstrom: nur tropfenweise. Bluttemperatur: 36,0° his 37,0°. Sauerstoff: 2,9 bis 3,25 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Mangelhafte Blutdurchströmung.

Versuch 21.
(Glyoxylsäure.)

Kaninchen: Nach 3 Hungertagen 3615 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 70 mm Hg. Blutstrom: ca. 75 ccm pro Minute. Bluttemperatur 37,0°. Sauerstoff: 2,5 bis 3,2 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Während des Versuches Gefäßbruch, Unterbindung.

Versuch 22.
(Glyoxylsäure.)

Kaninchen: 3280 g, nach 3 Hungertagen 3000 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 80 mm Hg. Blutstrom: ca. 76 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 39,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Vorzeitige Beendigung des Versuches wegen Gefäßbruches.

Versuch 23.
(Glyoxylsäure.)

Kaninchen: 3400 g, nach 3 Hungertagen 3100 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 60 mm Hg. Blutstrom: gleichmäßig, ca. 120 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0°. Sauerstoff: 3,0 bis 5,1 l pro 15 Minuten.

Versuch 24.

(Glykolsäure.)

Kaninchen: 3250 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 mm Hg. Blutstrom: sehr gut, bis 360 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 39,0°. Sauerstoff: 2,5 bis 3,25 l pro 15 Minuten.

Versuch 25.

(Glykolsäure.)

Kaninchen: 3000 g, nach 3 Hungertagen 2800 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 50 bis 70 mm Hg. Blutstrom: ca. 70 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0° bis 39,0°. Sauerstoff: 3,0 bis 3,3 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Vorzeitige Beendigung des Versuches wegen Gefäßbruchs.

Versuch 26.

(Glykolsäure.)

Kaninchen: 3450 g, nach 3 Hungertagen 3020 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 120 mm Hg. Blutstrom: anfangs gut, ca. 100 ccm pro Minute, dann zunehmend schlechter. Bluttemperatur: 36,0° bis 37,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten. Bemerkung: Blutdurchströmung mangelhaft; wegen Blutung wird ein kleiner Leberlappen abgebunden.

Versuch 27.

(Essigsäure.)

Kaninchen: 4250 g, nach 3 Hungertagen 3900 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 30 bis 50 mm Hg. Blutstrom: ca. 75 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 39,0°. Sauerstoff: 3,0 bis 3,4 l pro 15 Minuten.

Versuch 28.

(Essigsäure.)

Kaninchen: 3600 g, nach 4 Tagen Hunger 3200 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 80 mm Hg. Blutstrom: ca. 70 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 36,5° bis 38,5°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten.

Versuch 29.

(Essigsäure.)

Kaninchen: 2930 g, nach 3 Hungertagen 2650 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 100 mm Hg. Blutstrom: ca. 56 ccm pro Minute. Bluttemperatur: 38,0°. Sauerstoff: 3,0 l pro 15 Minuten.

Versuch 30.

(Glykokoll.)

Hund: 8200 g. Blutart: Kalb. Blutdruck: 40 bis 90 mm Hg. Bluttemperatur: 37,0° bis 38,0°. Sauerstoff: 3,1 bis 6,25 l pro 15 Minuten.

Druckfehlerberichtigung zur Arbeit: Beiträge zur Kenntnis der Fermente der Milchdrüse und der Milch

von

W. Grimmer.

(Biochem. Zeitschrift Bd. 53, 6.)

S. 437,	Zeile	5	von	unten	lies	Drüse	statt	Drüsen.
S. 437,	„	4	„	„	„	stand	„	standen.
S. 443,	„	17	„	oben	„	Fermente	„	Elemente.
S. 443,	„	1	„	unten	„	Protamine	„	Proteine.
S. 468,	„	11	„	„	„	Diaminosäuren	„	Aminosäuren.

Autorenverzeichnis.

1C


[redacted]







ALF Collections Vault
3 0000 091 477 277